

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA – FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

THAÍS MUNIZ MONTALVÃO SOUSA

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE PEQUI EM CÁPSULA NOS PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

BRASÍLIA – DF

2012

THAÍS MUNIZ MONTALVÃO SOUSA

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE PEQUI EM CÁPSULA NOS PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Áreas de concentração: Nutrição/Medicina/Biologia

Orientador: Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Luisa Miranda Vilela

BRASÍLIA – DF

2012

Aos meus pais, por todos os ensinamentos.
À minha irmã Laila pelo companheirismo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto, quem proporcionou a mim a oportunidade de ingressar na pós-graduação *stricto senso* e, com toda sua experiência, propiciou grande aprendizagem profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Ana Luisa Miranda Vilela, pela parceria científica e oportunidade de conhecimento na grande área da Genética e pelo despertar do interesse pelo conhecimento em Estatística.

À Profa. Dra. Édina Shisue Miazaki pelo grande auxílio na análise dos dados estatísticos.

Ao Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia pela parceria no laboratório Genética Toxicológica no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Aos colegas do Laboratório de Genética Toxicológica, por tantos ensinamentos em genética, auxílio em várias etapas dos experimentos, estímulo e apoio em todos os momentos da pesquisa. Em especial, à Mariana Roll e Ingrid Reale.

Aos servidores do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília por toda ajuda e apoio à pesquisa. Em especial, aos farmacêuticos Franco Batista Leite e Robério Antônio Araújo e aos funcionários Célya Gonçalves, Cristina Félix e Marco Rogério Mota Lemos.

Aos Laboratórios Sabin de Análises Clínicas pela parceria na mensuração do anti-DNA, em especial à funcionaria Paula Maestri por toda sua disponibilidade em me atender sempre que necessário.

Aos amigos do coração Tiago de Oliveira Menezes, Camila Ribeiro dos Santos Leal, Marilisa Dantas Lima, Rafaela Christina da Silva de Paula, Josué Rafael Ferreira Cunha por todo o apoio nessa etapa.

Ao Daniel de Sousa Michels por todo o carinho e compreensão na fase final dessa pós-graduação.

À minha irmã querida Laila Muniz Montalvão Sousa pela ajuda em todas as fases da pós-graduação, desde a inscrição da seleção à revisão gramatical da dissertação.

“A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade;
fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte“

Ernest Renan

RESUMO

Introdução: Indicadores de estresse oxidativo, tais como produtos de oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, estão aumentados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em comparação com indivíduos saudáveis. Como o estresse oxidativo tem sido implicado na fisiopatogenia do LES e na aterosclerose precoce nesses pacientes, uma possibilidade é o uso adjuvante de antioxidantes, particularmente as formas de suplementação natural.

Objetivos: Primários - verificar em pacientes com LES se a suplementação do óleo da polpa de pequi em cápsula reduz: 1) as lesões no DNA, mensuradas por meio do índice de dano ao DNA obtido com o ensaio do cometa; 2) o colesterol total e a fração lipoproteína de baixa densidade (LDL); 3) os níveis de proteína C reativa ultrasensível (PCRus); 4) os níveis de ácido úrico. Secundário – verificar, por meio de ensaio cometa, se o nível de dano ao DNA é aumentado nos pacientes com LES em relação ao apresentado por indivíduos controles saudáveis.

Pacientes e Métodos: Foi realizado um ensaio clínico controlado randomizado, cruzado, duplo-cego que consistiu em duas fases. Na primeira etapa, foram captados 38 pacientes entre 18 e 60 anos com LES e SLEDAI menor que 10 a partir de 73 lúpicos atendidos consecutivamente no ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Eles foram randomizados em dois grupos: no grupo um, 22 pacientes receberam uma cápsula de placebo por dia durante 60 dias consecutivos e, no grupo dois, 16 pacientes receberam 400 mg de óleo de pequi em cápsula por dia durante o mesmo período. Houve um intervalo de 60 dias (*wash –out*) e, depois, os pacientes trocaram de grupo de modo que quem recebeu óleo pequi passou a receber placebo e vice-e-versa também durante 60 dias consecutivos. Terminaram esse ensaio clínico 29 pacientes. Foram coletados sangue (para bioquímica, imunologia, hemograma e realização do ensaio do cometa), urina, dados sociais e antropométricos dos pacientes antes e depois de cada período, totalizando quatro coletas. Para atingir o objetivo secundário foi feito um estudo transversal com um grupo de 25 pacientes com LES pareados conforme gênero, idade e índice de massa corporal (IMC) com 25 controles saudáveis. Coletou-se sangue para realização do ensaio do cometa, dados sociais e antropométricos de todos os indivíduos.

Resultados: Para o estudo cruzado foram selecionadas 29 mulheres com média de idade 33,6 anos, média de IMC 24,1k g/m² e tempo médio de doença 7,8 anos. A maioria delas era solteira (55,2%), trabalhava fora de casa (51,7%), tinha renda familiar entre um e cinco salários mínimos (69%), concluiu o ensino médio (55,2%) e não praticava atividade física (72,4%). Utilizando como

parâmetro a prega cutânea tricipital (PCT), a maioria das pacientes foi classificada em pré-obesidade e obesidade (51,7%). Quando foram usados outros índices antropométricos grande parte delas foi classificada em eutrofia. Encontrou-se uma correlação inversa ($r = -0,414$ $p = 0,029$) entre o índice de dano ao DNA (%) e a lipoproteína de alta densidade (HDL). Houve também uma correlação inversa entre IMC e anos de estudo ($r = -0,537$ $p = 0,03$). Foi detectada uma diferença significativa das médias de índice de dano ao DNA (%) entre as praticantes de atividade física e as não praticantes ($p = 0,045$) e entre as usuárias de vitamina D e as não usuárias ($p = 0,006$). Além disso, ocorreu uma redução significativa da PCRus com o tratamento com óleo de pequi em cápsula. No estudo transversal foram avaliados 23 mulheres e dois homens com LES e 23 mulheres e dois homens do grupo controle. O nível de dano ao DNA foi significativamente maior no grupo LES que no grupo controle ($p = 0,000$). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a idade, IMC, circunferência da cintura e circunferência do quadril; todavia se detectou uma diferença significativa entre os grupos quanto a relação cintura/quadril. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto ocupação ($p = 0,011$), renda familiar ($p = 0,001$) e escolaridade ($p = 0,001$). Houve uma correlação positiva entre relação cintura/quadril e índice de dano ao DNA em ambos grupos.

Conclusões: O óleo de pequi em cápsula não foi capaz de reduzir significativamente o índice de danos no DNA, o colesterol total, a fração LDL e os níveis de ácido úrico em mulheres com LES; porém, esse mesmo óleo foi eficiente em reduzir os níveis de PCRus nestas pacientes, o que indica a redução da inflamação com uso desse suplemento antioxidante. Pacientes com LES tiveram maior dano ao DNA em relação a controles saudáveis, o que sugere um estresse oxidativo aumentado.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Antioxidante. Estresse oxidativo. Ensaio do cometa. Pequi. Estudo cruzado.

ABSTRACT

Introduction: Indicators of oxidative stress, such as products of oxidation of nucleic acid, proteins and lipids, are higher in SLE patients than in healthy subjects. As oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of SLE and early atherosclerosis in these patients, one possibility is the adjuvant use of antioxidants, particularly as natural supplements.

Objectives: Primary – to verify in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) whether supplementation with pequi pulp oil capsules reduces: 1) DNA damage, measured by the comet assay, 2) total cholesterol and low-density lipoprotein fraction (LDL), 3) the levels of ultrasensitive C-reactive protein (hsCRP), 4) the levels of uric acid. Secondary – to verify by comet assay if the DNA damage level in patients with SLE is higher than that presented by healthy control subjects.

Patients and Methods: A controlled randomized, crossover, double-blind study was conducted, consisting of two phases. In the first stage, 38 SLE patients were collected between the ages of 18 and 60, and SLEDAI less than 10, chosen from 73 lupus patients consecutively seen in the rheumatology clinic of the University Hospital of Brasília (HUB). They were randomized into two groups: one group of 22 patients received one placebo capsule per day for 60 consecutive days and, in group two, 16 patients received 400 mg pequi oil in capsule form per day over the same period. There was an interval of 60 days (wash-out), and then the patients switched groups so that those who had received pequi oil began to receive placebo and vice versa, also for 60 consecutive days. Twenty-nine patients finished this clinical trial. We collected blood (for biochemistry, immunology, blood count and completion of comet assay), urine, and anthropometric social data from patients before and after each period, totaling four collections. To achieve the secondary objective a cross-sectional study was done with a group of 25 SLE patients matched by gender, age and body mass index (BMI) with 25 healthy controls. Blood samples were taken to perform the comet assay, and anthropometric data were collected from all individuals.

Results: For the crossover study 29 women were selected with a mean age of 33.66 years, mean BMI of 24.1 g/m² k and mean disease duration of 7.8 years. Most of them were single (55.2%), worked outside the home (51.7%), had a family income of between one and five minimum wages (69%), had completed high school (55.2%) and did not practice physical activity (72.4%). Using as parameter triceps skinfold thickness (TSF), most patients were classified as overweight and obese (51.7%). Using other anthropometric indices, most of them were classified as eutrophic. An inverse correlation was found ($r = -0.414$ $p = 0.029$) between the index of DNA damage (%) and high

density lipoprotein (HDL). There was also an inverse correlation between BMI and years of education ($r = -0.537$ $p = 0.03$). A significant difference was detected in the average rate of DNA damage (%) between physical activity practitioners and non-practitioners ($p = 0.045$) and among users of vitamin D and non-users ($p = 0.006$). Moreover, there was a significant reduction in hsCRP treatment with pequi oil capsule. In a cross-sectional study 23 women and two men with SLE were evaluated, as were 23 women and two men in the control group. The level of DNA damage was significantly higher in the SLE group than in the control group ($p = 0.000$). No significant differences were found between groups in age, BMI, waist circumference and hip circumference. However, a significant difference was detected between groups in the waist / hip ratio. There was a significant difference between groups regarding occupation ($p = 0.011$), household income ($p = 0.001$) and education ($p = 0.001$). There was a positive correlation between waist-hip ratio and DNA damage in both groups.

Conclusions: Pequi oil capsule was not able to significantly reduce the DNA damage index, total cholesterol and LDL cholesterol and uric acid levels in women with SLE, but it was effective in reducing hsCRP levels in these patients, indicating reduced inflammation with the use of antioxidant supplementation. SLE patients had higher DNA damage (assessed by the comet assay) compared to healthy controls, suggesting increased oxidative stress.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus. Antioxidant. Oxidative stress. Comet assay. Pequi. Crossover study.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual do Índice de dano <u>a</u> o DNA em LES e controle no estudo transversal.....	43
Gráfico 2 – Características antropométricas das pacientes com LES no estudo cruzado.....	50
Gráfico 3 – Correlação entre Índice de dano <u>a</u> o DNA e HDL no estudo cruzado.....	52
Gráfico 4 – Correlação entre IMC e Escolaridade no estudo cruzado.....	53
Gráfico 5 – Percentual do Índice de dano <u>a</u> o DNA em pacientes com LES e praticantes e não praticantes de atividade física no estudo cruzado.....	54
Gráfico 6 – Percentual do Índice de dano <u>a</u> o DNA em usuários e não usuários de vitamina D no estudo cruzado.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e antropométricas e percentual de dano <u>ao</u> DNA em LES e controle no estudo transversal.....	44
Tabela 2 – Características do estilo de vida em LES e controle no estudo transversal.....	45
Tabela 3 – Características demográficas em LES e controle no estudo transversal.....	46
Tabela 4 – Características demográficas, antropométricas, laboratoriais e da doença das pacientes com LES no estudo cruzado antes de iniciarem o tratamento e o placebo.....	48
Tabela 5 – Características socioeconômicas das pacientes com LES no estudo cruzado.....	49
Tabela 6 – Perfil do uso de medicamentos pelas pacientes com LES no estudo cruzado.....	51
Tabela 7 – Índice de dano <u>ao</u> DNA, parâmetros antropométricos, marcadores inflamatórios e perfil lipídico com suplementação com óleo de pequi nas pacientes com LES.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	<i>America College of Rheumatology</i>
AEROSIL	dióxido de silicone coloidal
ANAs	anticorpos antinucleares
Anti- dsDNA	anticorpos anti-DNA de dupla hélice
ANOVA	análise de variância
AOPP	produtos proteicos de oxidação avançada
CAT	catálase
CAOT	capacidade antioxidante total
CB	circunferência do braço
CC	circunferência da cintura
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CL – LOOH	hidroperóxido lipídico
cm	centímetro
CMB	circunferência muscular do braço
CQ	circunferência do quadril
CT	colesterol total
DGRE	doença do refluxo gastroesofágico
DNA	ácido desoxirribonucleico
d - ROMs	<i>diacron reactive oxygen metabolites</i>
EAS	elementos anormais do sedimento
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAN	fator antinuclear
FM	Faculdade de Medicina
Gama GT	gama glutamil transferase
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
Gtox	Laboratório de Genética Toxicológica

HCM	hemoglobina corpuscular média
HDL	lipoproteína de alta densidade
HNE	4-hidroxinonenal
HOCL	ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IB	Instituto de Ciências Biológicas
%ID	percentual de índice de dano <u>a</u> o DNA
IL1	interleucina 1
IL2	interleucina 2
IMC	índice de massa corporal
Kg	quilograma
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LES	lúpus eritematoso sistêmico
m	metro
m ²	metro quadrado
ml	mililitros
mm	milímetro
μl	microlitro
MDA	malondialdeído
NO ⁻	óxido nítrico
O ₂ ⁻	superóxido
⁻ O ₂	oxigênio singlete
⁻ OH	radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	peroxinitrito
8 - oxod G	8 - oxodesoxiguanosina
PCR	proteína C reativa
PCRus	proteína C reativa ultra sensível
PCT	prega cutânea tricipital
r	coeficiente da correlação de Pearson

RDW	<i>red cell distribution width</i>
RNA	ácido ribonucleico
RO ₂ ⁻	radical peroxila
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SH	grupos sulfidril
SLEDAI	<i>systemic lupus erythematosus disease activity index</i>
SLICC	<i>systemic lupus international colaborating clinics</i>
SOD	superóxido dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Scienses</i>
TGL	triglicerídeos
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
TBARS	ácido tiobarbitúrico
UnB	Universidade de Brasília
UV	ultravioleta
VCM	volume corpuscular médio
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Lúpus eritematoso sistêmico.....	17
1.2 Estresse oxidativo e LES.....	21
1.3 Ensaio do cometa.....	25
1.4 Dieta e LES.....	28
1.5 Caryocar Brasiliense Camb (pequi).....	29
I I. JUSTIFICATIVA.....	32
I I I. OBJETIVOS.....	33
IV. METODOLOGIA DO ESTUDO.....	34
4.1 Materiais e métodos.....	34
4.2 Métodos estatísticos.....	42
V. RESULTADOS.....	43
5.1 Estudo transversal.....	43
5.2 Estudo cruzado.....	46
VI. DISCUSSÃO.....	57
6.1 Estudo transversal.....	57
6.2 Estudo cruzado.....	59
VII. LIMITAÇÕES.....	66
VIII. CONCLUSÕES.....	67
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

I. INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, complexa, multissistêmica, de natureza autoimune e de origem multifatorial que se caracteriza por um grande conjunto de anticorpos, em especial os anticorpos antinucleares (ANA), também conhecidos como fator antinuclear (FAN). Sua taxa de incidência varia de 1 a 10 a cada 100.000 pessoas/ano e sua taxa de prevalência de 20 a 70 a cada 100.000. Assim, é uma doença rara mais frequente em mulheres em idade fértil - entre 15 e 45 anos; entretanto, pode se manifestar em qualquer idade, até mesmo na primeira infância. O LES pode ser particularmente grave nos extremos da vida (infância e terceira idade). A relação entre homens e mulheres é de aproximadamente 1 para 10. Pode ocorrer também em todas as etnias, apesar de certos grupos étnicos terem uma maior incidência, como africanos e asiáticos (incidência 2 a 3 vezes maior), aborígenes australianos e grupos nativos americanos do Canadá e dos Estados Unidos (Patavino e Brady, 2001; Robbins e col., 1996; Borba e col., 2008; Pons-Estel e col., 2010).

O LES tem início agudo ou insidioso e evolui com manifestações clínicas polimórficas, com períodos de exacerbações e remissões, caracterizadas, principalmente, por lesões de pele, articulações, rins e membranas serosas. Porém, pode acometer qualquer órgão do corpo e a resposta de cada paciente é única (Patavino e Brady, 2001; Robbins e col., 1996; Borba e col., 2008). Os sinais e sintomas mais frequentes são: fadiga, dispneia, febre, anemia, perda ponderal, artralgia, artrite, rash malar (em forma de borboleta), fotossensibilidade, [alopecia](#), linfadenopatia, pleurite, pericardite, diarreia, vasculite, síndrome nefrítica, doenças do sistema nervoso central e distúrbios de personalidade (Patavino e Brady, 2001; Forte e col., 2003). Com tamanha variabilidade do quadro clínico, o Colégio Norte Americano de Reumatologia estabeleceu critérios para seu diagnóstico em 1982, revisados em 1997 (Robbins e col., 1996; Borba e col., 2008; Tan e col., 1982; Hochberg, 1997). Assim, para se classificar o diagnóstico é necessária a presença de, no mínimo, quatro dos 11 critérios (Anexo 1).

A causa do LES é ainda desconhecida; no entanto, sabe-se que existe a perda de mecanismos reguladores que mantêm a autotolerância a antígenos nucleares, o que resulta na deposição de imuno-complexos nos tecidos (Bosch, 2011; Robbins e col., 1996). A mudança da

resposta imune de [células T auxiliares](#) Th1 para Th2 resulta na hiperatividade das células B, na produção de auto-anticorpos patogênicos e na inflamação (Hsieh e Lin, 2011). Dessa forma, há anticorpos contra inúmeros componentes nucleares e citoplasmáticos da célula que não são específicos para órgão (Bosch, 2011; Ribas, 2007; Robbins e col., 1996). Os ANA podem ser agrupados em quatro categorias: - anticorpos contra o DNA (anti-DNA de dupla fita ou nativo – anti-dsDNA; anti-DNA de cadeia simples – anti-ssDNA); - anticorpos contra histonas (anti-histona); - anticorpos contra proteínas não histônicas ligadas ao RNA (anti-Sm; anti-SS-A/Ro; anti-SS-B/La; anti-nRNP); e, – anticorpos contra antígenos nucleolares (Bosch, 2011; Ribas, 2007; Robbins e col., 1996).

O anti-DNA está presente em aproximadamente 60% dos pacientes com LES clinicamente ativo e 25% dos pacientes com doença em remissão. Esse autoanticorpo é considerado um importante marcador da atividade de doença. O anticorpo anti-Sm está presente em 30% dos pacientes com LES, é altamente específico e não é detectado em indivíduos saudáveis e em pacientes com outras doenças reumáticas. Anticorpos anti-SS-A/Ro são encontrados em 35% em pacientes com LES e o SS-B/La em aproximadamente 15% (Ribas, 2007).

Os anti-dsDNA podem contribuir para o dano tecidual por múltiplos mecanismos. Um deles é a ativação da cascata do sistema de complemento, com o consequente recrutamento de células inflamatórias para o local de deposição do imuno-complexo e a ativação direta de células inflamatórias por meio do envolvimento do receptor Fc por imuno-complexos (Diamond e col., 2011). Os imuno-complexos também induzem as células dendríticas plasmocitóides a secretar interferons do tipo 1 (Bosch, 2011). Além dos ANA, os pacientes lúpicos possuem inúmeros outros autoanticorpos: alguns reagem contra elementos do sangue, outros contra fosfolipídios. Os fosfolipídios são necessários para coagulação do sangue: pacientes com anticorpos contra essas substâncias podem apresentar alterações nos testes de coagulação e, eventualmente, manifestações de hipercoagulabilidade (Robbins e col., 1996).

O LES é uma doença heterogênea com a produção de autoanticorpos diferentes, regulada por fatores genéticos distintos (Robbins e col., 1996). A constituição genética regula a produção de autoanticorpos, como os genes MHC. Polimorfismos específicos do *locus* HLA-DQ foram ligados à produção de anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm e antifosfolipídios. Além disso, alguns pacientes lúpicos apresentam deficiências herdadas dos componentes iniciais do complemento, como C4. A

ausência de complemento provavelmente prejudica a depuração de imunocomplexos circulantes pelo sistema fagocitário mononuclear e favorece a deposição no tecido. A produção de anticorpos lesivos para o tecido é determinada por autoantígenos e resulta de uma resposta oligoclonal da célula B que não difere da resposta a antígenos estranhos (Robbins e col., 1996). Outra característica do LES é a expressão de genes específicos de neutrófilos, correlacionados com atividade de doença (Bosch, 2011).

Entretanto, a expressão do LES também é influenciada por fatores não-genéticos, a exemplo dos ambientais. Drogas como hidralazina e carbamazepina podem induzir o lúpus como resultado de uma reação adversa. Em muitos casos, os sintomas desaparecem com a descontinuação do uso da droga (Patavino e Brady, 2001; Robbins e col., 1996). A exposição ultravioleta (UV) é outro fator que resulta e exacerba a doença em muitos indivíduos (Robbins e col., 1996). A luz UV pode induzir partículas autoantigênicas apoptóticas resultando em peroxidação do DNA e aumento da regulação de algumas citocinas e fatores quimiotáticos (Zhang e col., 2011). Os hormônios sexuais também parecem exercer influência importante na ocorrência e nas manifestações do LES, pois a frequência dessa doença é 10 vezes maior em mulheres que em homens durante os anos reprodutivos (Robbins e col., 1996). O tabagismo também exerce alguns efeitos imunoinflamatórios capazes de piorar ou até mesmo de induzir doenças autoimunes como o LES (Doria e col., 2008). Dessa forma, as interações de fatores genéticos, hormonais e ambientais atuam em conjunto para ativar as células T auxiliares e as células B o que causa a produção de vários autoanticorpos (Robbins e col., 1996).

O tratamento medicamentoso deve ser individualizado e depende dos órgãos ou dos sistemas acometidos e da gravidade desses acometimentos. Os glicocorticoides, como a prednisona, são os fármacos mais utilizados no tratamento do LES tanto para suprimir a resposta autoimune agressiva quanto para estabilizar a inflamação resultante. E, em virtude de seus efeitos colaterais, como complicações músculo-esqueléticas, por exemplo necrose avascular, eles devem ser utilizados na menor dose efetiva para controle da atividade da doença e com redução gradual da dose, assim que possível. Os pacientes que não conseguem atingir a dose de manutenção de glicocorticoides igual ou menor a 7,5mg/dia, devem associá-los a outra droga. A prednisona tem efeitos nas interleucinas 1 e 2. A interleucina 2 (IL2) tem um papel chave na proliferação das células T. A produção espontânea de interleucina 1 (IL1) é pró-inflamatória e pode inibir a utilização de IL2 pelas células

T. A prednisona reduz a produção espontânea de IL1 (Patavino e Brady, 2001; Borba e col., 2008).

A cloroquina é um medicamento essencial para controlar a atividade da doença, pois reduz a incidência de lesões cutâneas e renais e pode poupar o uso de corticoides. Os efeitos colaterais são mais brandos, como mudança da coloração da pele. As drogas imunossupressoras, como ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato e micofenolato de mofetil também podem ser utilizadas dependendo da gravidade do caso. Esses medicamentos podem provocar vários efeitos colaterais, como citopenia, hepatite, náusea, vômito, estomatite e distúrbios no sistema nervoso central. Quando houver manifestação da doença que não responda à determinada droga, pode ser necessário fazer uso concomitante de diversos medicamentos (Patavino e Brady, 2001; Borba e cols, 2008).

O acompanhamento do tratamento dos pacientes lúpicos pode ser fundamentado em instrumentos que sejam capazes de medir de maneira objetiva a atividade inflamatória da doença e sua sequela. O principal índice de atividade atualmente utilizado é o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (Anexo 2), composto por 24 itens inclusive sinais, sintomas e testes laboratoriais com variação do peso de 1 a 8, conforme a importância do item. A soma da pontuação desses itens é o escore final, que varia de 0 a 105; quanto maior o escore final, maior a atividade de doença (Bombardier e col., 1992; Borba e col., 2008). O SLEDAI menor que cinco é considerado atividade leve do LES; de cinco a 10 moderada e; acima de 10, severa (Nossent, 1998). A verificação de lesão irreversível ou sequela decorrente da doença ou dano orgânico cumulativo desde o início do LES devido à doença, tratamento ou comorbidades pode ser medida por meio do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology* (SLICC/ACR) (Anexo 3). São considerados 12 sistemas orgânicos e o dano deve estar presente há, pelo menos, seis meses. Esse índice pode ficar estável ou aumentar com o decorrer do tempo; sua pontuação vai de 0 a 47 (Gladman e col., 1996; Borba e col., 2008).

Com um protocolo de tratamento bem estabelecido e o desenvolvimento de testes laboratoriais para detectar os ANA – o que possibilita o diagnóstico precoce do LES – a sobrevida aumentou de 50% em cinco anos em 1950 para mais de 90% em cinco anos desde o meio dos anos 70 e por volta de 80% em 15 a 20 anos. Entretanto, alguns grupos podem apresentar maior risco de complicações, como maior morbimortalidade em negros, hispânicos e indígenas norte-americanos quando não se realiza o ajuste para o *status* socioeconômico, como nível educacional e renda. Os estudos que realizaram esse ajuste não detectaram essa diferença por etnia. Todavia, há

componentes genéticos específicos da etnia que provavelmente podem ser refletidos no início do curso da doença, enquanto que diferenças tardias observadas podem ser mais indicativas de *status* socioeconômico e acesso a cuidados médicos (Doria e col., 2008; Pons-Estel e col., 2010).

1.2 Estresse oxidativo e LES

O balanço redução-oxidação (também conhecido como redox) em sistemas biológicos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons, que sofrem frequentes interconversões entre o estado reduzido e oxidado. Modificações no balanço redox de sistemas biológicos podem causar o estresse oxidativo. A intensidade e a patogenicidade desses desequilíbrios vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes (Vasconcelos e col., 2007).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, são moléculas de curta duração formadas por reações químicas capazes de modificar rapidamente outras moléculas. Por meio dessas modificações, elas agem como moléculas de sinalização para uma ampla gama de funções celulares (Oetes, 2010). Assim, sua produção é parte integrante do metabolismo humano, com importantes funções biológicas (Vasconcelos e col., 2007). Pequenas flutuações na concentração de algumas ERO e ERN podem ter um papel na sinalização intracelular na fisiologia normal (Bayir e Kagan, 2008). Quando a produção dessas espécies é aumentada, o organismo controla e reestabelece o equilíbrio por meio de seu eficiente sistema antioxidante (Vasconcelos e col., 2007). Contudo, aumentos descontrolados na geração das ERO e ERN, excedendo a capacidade dos mecanismos antioxidantes de defesa, resultam em estresse oxidativo e nitrosativo (Bayir e Kagan, 2008).

Esse estado tem importância na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, como as doenças autoimunes, pois as ERO e ERN atacam macromoléculas como carboidratos, proteínas, DNA e lipídios, causando danos celulares (Vasconcelos e col., 2007). As proteínas são um dos principais alvos dessas espécies, pois elas são os principais componentes de muitos tecidos, células e plasma e exibem rápidas taxas de reação com muitos oxidantes (Zhang e col., 2009). As espécies reativas com maior importância biológica são: (1) as espécies derivadas de oxigênio, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), radical peroxila (RO_2^{\bullet}), oxigênio singlete (1O_2); (2) as espécies derivadas de nitrogênio, como óxido nítrico (NO^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$); e

(3) as espécies derivadas de cloro, como ácido hipocloroso (HOCL) (Cerchiaro e Honório, 2011; Vasconcelos e col., 2007).

O sangue humano é uma excelente fonte de marcadores *in vivo* do estresse oxidativo, pois nele são transportados e redistribuídos antioxidantes. É considerado uma amostra biológica única e pode descrever o estado de saúde de um indivíduo no momento da coleta. A análise do balanço redox pode ser realizada em soro e/ou plasma e /ou eritrócitos (Vasconcelos e col., 2007).

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a [glutathione](#) peroxidase (GPx). O não enzimático é formado por muitas substâncias como a glutathione (GSH) - principal composto antioxidante intracelular -, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição [tais como](#) a transferrina e a ceruloplasmina, entre outras. Há também os biomarcadores de dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio como malondialdeído (MDA), isoprostanos, lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares. Além desses marcadores citados, há a capacidade antioxidante total (CAOT) que, ao invés de analisar antioxidantes isolados, considera a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes. Para medir a CAOT realizam-se ensaios de captação em que um radical é gerado e reage com moléculas-alvo para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência ou outra mudança mensurável. Um outro marcador de dano em macromolécula é o teste do cometa, que detecta o dano [ao](#) DNA em leucócitos (Vasconcelos e col., 2007).

O amplo fenótipo do LES é unificado pela produção de autoanticorpos, uma função da resposta imune adquirida. Todavia, uma resposta imune inata inapropriadamente ativa e mantida é implicada nas consequências patogênicas, de iniciação da produção de autoanticorpos no LES e de deposição de imunocomplexos que resulta em dano aos tecidos (Oetes, 2010; Pérez e col., 2012). Uma importante parte da resposta imune inata é a produção de espécies reativas (Oetes, 2010). O aumento na produção dessas espécies pode favorecer o desenvolvimento do LES, pois o estresse oxidativo causa imuno-modulação (Hassan, 2011). Assim, esse desequilíbrio pode contribuir para a disfunção das células do sistema imunológico, a produção de autoantígenos e a reatividade de autoanticorpos. Além disso, proteínas oxidativamente modificadas são responsáveis por perturbações adicionais em doenças autoimunes, pois representam alvos potenciais para o sistema

imune pela quebra da tolerância das células B (Lozovoy e col., 2011). A susceptibilidade ao estresse oxidativo é também influenciada por polimorfismos genéticos da superóxido dismutase e de outras enzimas antioxidantes, níveis endógenos de antioxidantes como ácido L-ascórbico e α -tocoferol e níveis de glutathione eritrocitária (Rastmanesh e Baer, 2011).

A peroxidação lipídica leva à formação de aldeídos altamente reativos como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), que podem se ligar a proteínas e, assim, resultar em sua modificação estrutural e afetar suas funções biológicas. Aumentos no estresse oxidativo e na formação de MDA e HNE estão associados com LES. Entretanto, o papel potencial do estresse oxidativo, especialmente a consequência da modificação oxidativa de proteínas pelo MDA e pelo HNE na patogênese e progressão do LES permanece obscura (Wang e col., 2010).

A ação das espécies reativas leva à formação de proteínas carboniladas, 3-nitrotirosina e hidroperóxido de proteína. O grupo proteína tiol pode inibir a formação de hidroperóxido de proteína pela remoção do radical peroxil. Os níveis de proteína carbonilada, de 3-nitrotirosina e do grupo proteína tiol podem refletir aproximadamente o nível total de oxidação proteica em LES (Zhang e col., 2009). Proteínas oxidadas também causam distúrbios fisiológicos, inclusive perda de estrutura e função. Alterações em sequências de aminoácidos ou em sua estrutura podem gerar neo-epítomos das próprias proteínas, causando um agressivo ataque autoimune. A oxidação causa modificações pós-traducionais das proteínas que permitem um reconhecimento dos novos epítomos estimulando células B e/ou células T o que leva a uma quebra da tolerância (Lozovoy e col., 2011).

Assim, o aumento significativo do dano oxidativo mediado por ERO e ERN, com níveis aumentados de MDA, dienos conjugados 4-HNE e reduzidos níveis de enzimas antioxidantes (SOD extracelular, catalase e GPx) ocorrem no soro de pacientes com LES, se comparados a controles. Modificações nos níveis de enzimas antioxidantes e antioxidantes, junto com níveis alterados de ceruloplasmina, transferrina, elementos-traço, perfil de ácido graxo e o aumento de citocinas pro-inflamatórias podem ser responsáveis pela severidade da doença encontrada em sua fase aguda (Kurien e Scofield, 2006).

A inflamação crônica também está associada com o aumento do estresse oxidativo (Avalos e col., 2007) e os pacientes com LES estão em um estado de inflamação crônica no decorrer da doença. Esse estado leva ao acúmulo de neutrófilos nos tecidos que, ativados, produzem grande quantidade de mieloperoxidase e, com sua reação com H_2O_2 , resulta em maior produção de HOCL

(Zhang e col., 2009). Por outro lado, o estresse oxidativo também contribui para a inflamação crônica dos tecidos. O potencial do estresse oxidativo para induzir uma resposta autoimune ou para contribuir para patogênese da doença tem sido pouco utilizado em estudos de prognóstico (Hassan, 2011). Medicamentos usados, inclusive esteroides e metotrexato, estão relacionadas aos altos níveis de desequilíbrio oxidante/antioxidante o que sugere uma ação pró-oxidante (Hassan e col., 2011).

Há várias consequências secundárias do estresse oxidativo nos pacientes com LES, como sua associação com a fadiga (Avalos e col., 2007), com o desenvolvimento de fibrose microvascular progressiva (Zhang e col., 2009), com a alopecia, com a nefrite (Hassan e col., 2011) e com o perfil lipídico aterogênico (Nuttall e col., 2003). Ademais, esse estado desempenha um papel central na dislipidemia e na aterosclerose (Hassan, 2011) e é um importante mediador de hipertensão arterial mediada por mecanismos autoimunes (Mathis e col., 2012).

Os estudos que avaliaram a associação entre LES e o estresse oxidativo possuem resultados contraditórios. Wang e col. (2010) demonstraram um aumento significativo no estresse oxidativo/nitrosativo em pacientes com LES, indicando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e mecanismos de defesa antioxidante. Sugeriram que modificações oxidativas de proteínas endógenas devido MDA, HNE ou ONOO⁻ podem induzir uma resposta autoimune pelo estímulo à linfócitos T e/ou B. Concluíram que marcadores do estresse oxidativo/nitrosativo podem ser úteis na avaliação da atividade de doença em LES e, assim, na progressão de doença (Wang e col., 2010). Entretanto, Pérez e col. (2012) afirmaram que pacientes com LES apresentam aumento no estresse oxidativo apesar dessa resposta não estar correlacionada com atividade de doença e sua duração. Níveis de MDA e grupos sulfidril (SH) podem ser usados como biomarcadores para medir o estresse oxidativo em pacientes com LES, enquanto que o ácido úrico não pode ser usado com o mesmo propósito (Pérez e col., 2012). Outro estudo mostrou que pacientes com LES apresentam um estado persistente de estresse oxidativo e oxidação proteica mesmo em doença inativa ou em baixa atividade de doença. Até em baixa atividade de doença, há uma persistência da condição inflamatória o que favorece o estresse oxidativo. Em comparação com pacientes com doença inativa, pacientes com doença ativa não apresentam modificações no estresse oxidativo e nem na capacidade antioxidante, devido às drogas antioxidantes usadas no tratamento do LES, especialmente a prednisona (Lozovoy e col., 2012).

Zhand e col. (2009) identificaram a presença de estresse oxidativo em pacientes com LES,

sugerindo que a oxidação proteica pode ter um papel na patogênese do dano crônico aos órgãos no LES (Zhang e col., 2009). Já Avalos e col. (2007) não encontraram diferenças entre controles e pacientes com LES com doença estável quando mensuraram o estresse oxidativo por meio da excreção de isoprostano (Avalos e col., 2007).

Apesar das proteínas oxidadas serem citadas como a principal causa dos distúrbios fisiológicos (Zhang e col., 2010), pacientes com LES também apresentam aumento dos níveis de danos no DNA, verificado pelo aumento dos níveis de bases oxidadas como a 8-desoxi-guanina (8-oxoG). Tal aumento tem sido principalmente associado à manutenção de uma forma de DNA antigênico na circulação (DNA de baixo peso molecular associado a complexos imunes circulantes) (Lunec e col., 1994) e a um mecanismo defeituoso de reparo de danos no DNA (Bashir e col., 1993; Evans et al., 2000). Esses, por sua vez, poderiam estar associados com um aumento: (1) da produção de intermediários reativos de oxigênio na inflamação (Bashir e col., 1993); (2) de aldeídos derivados da peroxidação lipídica, que são capazes de mutações no DNA ao formar adutos de DNA; e (3) de metabólitos do estrogênio, que podem causar danos no DNA direta ou indiretamente por meio de processos cíclicos redox que geram espécies reativas (De Bont e van Larebeke, 2004); o último explicando pelo menos em parte a incidência 10 vezes maior de LES em mulheres que em homens durante os anos reprodutivos (Robbins e col., 1996).

1.3 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, também chamado ensaio de eletroforese em gel de célula única, ou de eletroforese em microgel (Ostling, K.J. Johanson, 1984), é uma técnica rápida, simples, visual e sensível, amplamente usada para medir e analisar danos no DNA (Ostling e Johanson, 1984; Singh e col., 1988). Serve tanto para detecção de quebras de fita simples quanto dupla (Fairbairn e col., 1995; Dusinska e Collins, 2008) em células de mamíferos a um baixo custo (McKelvey-Martin e col., 1993) em sistemas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (Ceneli e col., 2009). A metodologia desse teste foi desenvolvida em meados dos anos 80, originalmente introduzida por Östling e Johanson, para visualização direta de dano ao DNA em células individuais. Esse método consistia em realizar a eletroforese de células irradiadas com raios gama embebidas em agarose, e depois lisadas, sendo a lise e a eletroforese realizadas a um pH 9,5 o que significa que não havia separação das cadeias de DNA. Depois, as células eram submetidas a um corante fluorescente e se assemelhavam com um

cometa, com cabeça e cauda (Ostling e Johanson, 1984).

Depois, Singh e colaboradores modificaram essa técnica com a realização da eletroforese em um pH alcalino (Singh e col, 1988) com o foco principal de maximizar a sensibilidade de detecção de baixos níveis de dano ao DNA (Fairbairn e col., 1995). Assim, o pH acima de 12,3 foi utilizado para facilitar a desnaturação, o desenrolamento e a expressão de quebras na fita simples, assim como mostrar danos no DNA que só se tornam aparentes após a exposição a um meio alcalino, as chamadas lesões álcali-lábeis (Fairbairn e col., 1995). A diferença entre o resultado das duas técnicas é que na neutra, a cauda do cometa consiste em *loops* relaxados de DNA e na alcalina, a cauda é constituída de fragmentos de DNA (Klaude e col., 1996).

As quebras de fitas simples podem ter uma profunda influência no comportamento do DNA, pois ele está superenovelado no núcleo. A molécula de DNA nas células eucarióticas tem 50 a 100 cm de comprimento e deve ser enovelada para caber dentro de um núcleo de 5 a 10µm de diâmetro. A quebra de fita simples libera esse enovelamento e induz a um relaxamento da estrutura do DNA (McKelvey-Martin e col.; 1993) que pode ser esticado pela eletroforese (Ostling e Johanson, 1984). O teste do cometa permite a detecção de diferenças inter-células em dano e reparo no DNA em células eucarióticas (McKelvey-Martin e col.; 1993). Os danos no DNA consistem, principalmente, em lesões temporárias. Assim, esses danos representam um estado dinâmico constante, com o saldo entre quebra e reparação (Dusinska e Collins, 2008).

De forma resumida, o ensaio do cometa consiste em suspender as células em agarose em baixo ponto de fusão (*low melting*) fundidas em uma lâmina. Depois de secas, as lâminas são mergulhadas em um solução de lise (Fairbairn e col., 1995) com o intuito de permeabilizar as células. Assim, as membranas celulares, os componentes solúveis e as proteínas nucleares são extraídas e o DNA super-enovelado permanece dentro de uma estrutura do tipo núcleo, chamado nucleoide (McKelvey-Martin e col.; 1993; Dusinska e Collins, 2008). Após essa etapa, as lâminas são incubadas em solução alcalina de eletroforese (Fairbairn e col., 1995) para permitir o desenrolamento do DNA (McKelvey-Martin e col.; 1993). A seguir, é realizada a eletroforese para formar os cometas a partir do princípio de liberação do DNA danificado do nucleoide (Fairbairn e col., 1995). As lâminas são então lavadas com solução de neutralização para evitar interferência de alcalis com a coloração (McKelvey-Martin e col.; 1993). Depois, são marcadas com uma solução fluorescente, como brometo de etídeo, para a análise de imagem (Fairbairn e col., 1995) por

microscopia de fluorescência (Dusinska e Collins, 2008).

A técnica visual de análise das células é a forma mais simples de analisar os cometas pela base de extensão do dano e tem sido utilizado com sucesso. No entanto, reconhece-se que a análise por imagem melhora significativamente a sensibilidade (Fairbairn e col., 1995), apesar de já se ter comparado os dois métodos e constatado que os resultados de ambos se correlacionaram muito bem (Dusinska e Collins, 2008). Todas as etapas do ensaio do cometa devem ser realizadas sob luz amarela, luz vermelha ou no escuro, para prevenir danos adicionais no DNA (McKelvey-Martin e col.; 1993).

É possível avaliar os cometas a partir de sua aparência e graduar os níveis de dano, com precauções para evitar viés do observador. A distância de migração do DNA do nucléolo é usado para avaliar a extensão de dano ao DNA. Há também o método de momento da cauda definido como produto do comprimento da cauda e a fração total de DNA na cauda (Fairbairn e col., 1995). A capacidade de migração do DNA ocorre em função do tamanho do DNA e do número de quebras nas extremidades. O tamanho da cauda aumenta, inicialmente, conforme o dano, mas atinge um máximo que é definido, em grande parte, pelas condições de eletroforese e não pelo tamanho dos fragmentos (Fairbairn e col., 1995).

Os níveis de migração de DNA a partir do núcleo em direção ao ânodo é observado nas células com dano aumentado, após coradas com brometo de etídeo. Cada célula danificada tem a aparência de um cometa, com a cabeça fluorescente brilhante e uma cauda cujo comprimento e intensidade de fluorescência é relacionado ao número de quebras em fita de DNA. Células sem danos aparecem com um núcleo intacto (cabeça do cometa) e sem cauda (McKelvey-Martin e col.; 1993). Os cometas são classificados em cinco categorias (de 0 a 4) conforme a extensão de migração do DNA. Essa classificação é realizada de acordo com a aparência dos cometas, por exemplo comprimento de cauda, diâmetro da cabeça e intensidade. Aqueles com cabeça brilhante e sem cauda aparente são designados como 0, já aqueles com cabeça muito pequena e cauda muito alongada são classificados como 4. Cometas que apresentam características intermediárias entre as categorias 0 e 4 são facilmente distinguíveis e atribuídas as categorias 1, 2 e 3 (Jaloszynski e col., 1997).

Os linfócitos do sangue periférico são o tipo celular mais comumente estudado por meio do ensaio do cometa (Jaloszynski e col., 1997), pois o sangue é facilmente coletado. Esse teste é uma

ferramenta útil para relacionar questões relativas ao estresse oxidativo em linfócitos humanos. Tem sido usado como biomarcador de patologias, revelado os efeitos pro-oxidantes/antioxidantes de vários compostos endógenos e exógenos e considerado uma técnica válida para avaliar se antioxidantes/micronutrientes são capazes de proteger a integridade do material genético (Ceneli e col., 2009).

O ensaio do cometa já foi realizado para verificação da associação entre o estresse oxidativo e o dano ao DNA na artrite reumatoide com o intuito de elucidar a patogênese da doença (Karaman e col., 2011). Já foi utilizado também para averiguar a eficácia de terapias oncológicas por meio do índice de dano ao DNA (McKenna e col., 2008), usado como biomarcador de um estudo para verificar os efeitos da nutrição no câncer por meio de dano e reparação no DNA (Wasson e col., 2008) bem como para investigar a diferença de dano ao DNA entre pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e controles (Ibarra-Costilla e col., 2010). Todavia, ainda não foi utilizado para verificar se há aumento do estresse oxidativo com aumento dos índices de dano ao DNA em pacientes com LES.

1.4 Dieta e LES

Fatores dietéticos são importantes reguladores da função imune (Hsieh e Lin, 2011), apesar de não existir nenhuma recomendação dietética especificamente para pacientes com LES. Contudo, esses pacientes podem se beneficiar de uma dieta balanceada limitada em calorias e gordura, principalmente gordura saturada e ácidos graxos polinsaturados ômega 6. E, ainda, uma dieta que contenha ricas fontes de vitamina E, vitamina A, selênio, cálcio e ácido graxo polinsaturado ômega 3 (Brown, 2000). Em modelos animais, a restrição calórica, a suplementação de ácidos graxos ômega 3 e de vitamina A aliviam doença renal autoimune e prolongam a sobrevida (Hsieh e Lin, 2011). Outro estudo com modelos murinos demonstra a redução do estresse oxidativo renal e a diminuição da excreção urinária de albumina com o uso de terapia antioxidante. Também sugere que o uso de antioxidantes orais é capaz de reduzir o estresse oxidativo renal (Mathis e col., 2012). A vitamina E com suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias alivia a severidade do LES (Hsieh e Lin, 2011).

Antioxidantes protegem contra danos teciduais causados por EROs geradas por macrófagos, monócitos e granulócitos ativados e suprimem a atividade de citocinas, como o fator de necrose tumoral- α . Em modelos murinos de LES, suplementação com antioxidantes - inclusive β -caroteno,

α -tocoferol, ácido ascórbico e selênio - reduz a produção de autoanticorpos, atrasa o início da proteinúria e aumenta a sobrevida (Costenbader e col., 2010; Hsieh e Lin, 2011). Em pacientes com LES, a suplementação com antioxidantes como vitamina A, E e β -caroteno pode melhorar a condição de doença (Patavino e Brady, 2001).

Um estudo observacional demonstrou que a ingestão de vitamina C foi inversamente associada ao risco de atividade de doença do LES. A ingestão da vitamina, uma das vitaminas antioxidantes, aumenta sua concentração no plasma e pode exercer efeitos benéficos no reparo de componentes imunes e inflamatórios anormais. Assim, a vitamina C pode reduzir o estado de estresse oxidativo em LES e suprimir a produção de autoanticorpos o que leva a prevenção de atividade de doença (MINAMI e col., 2003). Dessa forma, antioxidantes podem proteger contra o desenvolvimento de LES por combater o estresse oxidativo (Hassan e col., 2011). Apesar desses estudos, uma pesquisa mostra que a ingestão regular de vários antioxidantes em alimentos e em suplementos não tem efeito com relação à proteção contra o desenvolvimento de LES (Costenbader e col., 2010).

Há evidências que a suplementação do ácido graxo ômega 3 e de antioxidantes reduzem o dano provocado por espécies reativas e pela inflamação, melhora a imuno-regulação e diminui os riscos cardiovasculares e o risco de doença renal. O ômega 3 proveniente de óleo de peixe pode ter a habilidade de inibir a atividade autoimune anormal das células B e dos linfócitos T e inibir a expressão anormal de interleucina. Também parece ter um efeito de controlar as placas ateroscleróticas pelo aumento dos níveis de HDL e redução de triglicerídeos e VLDL (Patavino e Brady, 2001).

Assim, a inibição do estresse oxidativo pode representar novas descobertas de alvos moleculares e celulares para o tratamento do LES (Hassan e col., 2011). Embora esse seja ainda um assunto controverso, é possível que a administração de antioxidantes ou outra modulação dietética possa melhorar a doença de pacientes com LES (Kurien e Scofield, 2006).

1.5 *Caryocar Brasiliense Camb*

A espécie *Caryocar brasiliense Camb*, conhecida como pequi, é uma típica árvore do cerrado com um amplo uso de todas as suas partes, com destaque para o fruto (Alves e col., 2008), que é bem conhecido na culinária regional, na medicina popular e por seu alto valor nutricional

(Miranda-Vilela e col., 2009 c). Porém, sua frutificação ocorre apenas de novembro a fevereiro o que limita a comercialização e o acesso da população ao pequi (Alves e col., 2008). Na medicina popular, o óleo de pequi é considerado um tônico e pode ser usado no tratamento de bronquite, resfriados, influenza e em manifestações de deficiência de vitamina A (Ribeiro e col., 2012).

A composição química da polpa de seu fruto varia conforme a região e o clima onde o pequi é plantado. Assim, há 20 a 27% de lipídeos, 2,2 a 6% de proteínas, 11,65% de fibras e 19,7% de carboidratos, além de conter diferentes antioxidantes como carotenoides, inclusive β -caroteno, licopeno, ζ -caroteno, criptoflavona, anteroxantina, zeaxantina, mutatoxantina, violoxantina, luteína e neoxantina, vitamina C, componentes fenólicos (flavonóides e taninos). Em sua composição de ácidos graxos, há ácido oléico monoinsaturado (48,7 a 54%), ácido palmítico saturado (39 a 44,3%) além de outros constituintes em menor quantidade, como ácidos palmitoleico (0,67%), linoléico (1,36%), linolênico (0,51%), esteárico (1,28%) e araquidônico - 0,12% (Miranda-Vilela e col., 2009 c). Devido ao seu baixo teor de ácidos graxos polinsaturados e alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, o óleo de pequi pode ser usado em processos que envolvam cocção e fritura (Ribeiro e col., 2012).

O extrato do óleo do pequi é realizado a partir da polpa imediatamente após a remoção da casca. Existem alguns tipos de extratos descritos na literatura: (1) extrato orgânico que pode ser extraído por vários tipos de solventes (n-hexânico, clorofórmico, acetona, etil-éter); (2) extrato aquoso; (3) extrato etanólico; (4) extrato hidro-etanólico e (5) extração mecânica (Ribeiro e col., 2012; Miranda-Vilela e col., 2009 c). O método de extração pode provocar modificações nas propriedades físico-químicas do óleo que pode resultar em um óleo inapropriado ao consumo humano. Altas temperaturas, longos períodos de exposição térmica e altas concentrações de oxigênio podem levar à peroxidação lipídica do óleo (Ribeiro e col., 2012).

Um estudo analisou quatro métodos de extração de óleo de pequi: (1) extração orgânica pelo solvente acetona, (2) extração orgânica pelo solvente etil-éter, (3) extração mecânica por prensagem e (4) extração aquosa por flotação em água quente. Foram analisadas propriedades físico-químicas, coloração e teor de carotenoides e β -caroteno em três tempos diferentes: no dia da extração, no 90º dia de estocagem e no 180º dia de estocagem. O extrato com maior rendimento foi o orgânico extraído pelo solvente acetona (60,53%) e o pior por flotação em água quente (19,37%). O extrato mecânico teve o maior teor de peróxido, o que mostra uma maior vulnerabilidade do óleo durante

esse tipo de extração, e o maior nível de acidez, o que indica uma maior decomposição do óleo, provavelmente devido às altas temperaturas aplicadas nesse método de extração. O maior teor de carotenoides foi encontrado nos extratos orgânicos. O único extrato que não apresentou uma redução do teor de carotenóides durante a estocagem foi o por flotação em água quente e o que apresentou a maior diminuição desse antioxidante após 180 dias foi o mecânico (Ribeiro e col., 2012).

Um estudo realizado com corredores de rua saudáveis de ambos os sexos que receberam suplementação de 400mg de óleo de pequi, por extrato clorofórmico, durante 14 dias consecutivos mostraram que houve redução significativa dos danos ao DNA (teste do cometa), das lesões de tecidos (níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), da lesão muscular (creatina quinase) e da peroxidação lipídica (ácido tiobarbitúrico - TBARS) – este último apenas nos homens (Miranda-Vilela e col., 2009 a). Outro achado significativo foi a redução significativa do colesterol total, do LDL no grupo acima de 45 anos, principalmente em homens. Os autores sugeriram que o óleo tem um possível efeito na redução da pressão arterial e redução da inflamação provocada pelo exercício (redução da proteína C reativa – PCR e do TBARS), principalmente em homens (Miranda-Vilela e col., 2009 b).

O uso de cápsulas de pequi apresentou efeitos colaterais em cerca de 15% dos sujeitos do estudo e foram limitados aos primeiros quatro dias de uso como: insônia, diarreia, constipação, flatulência, azia e acne. Porém, não houve desistência devido a esses efeitos (Miranda-Vilela e col., 2009 b).

II. JUSTIFICATIVA

Os pacientes com LES possuem um desequilíbrio no sistema oxidante/anti-oxidante, promovendo a formação de ERO. Porém, ainda não há relatos na literatura de comprovação do aumento de danos no DNA por meio do ensaio do cometa nesses pacientes, devido ao estresse oxidativo aumentado, o que poderia estar relacionado com a fisiopatogenia da atividade da doença. O *status* antioxidante do plasma sanguíneo é diretamente relacionado à dieta e é definido por antioxidantes como os carotenoides - que são os supressores biológicos mais potentes de oxigênio singlete - e flavonóides. O pequi contém ambas as substâncias. Assim, torna-se plausível primeiro, a verificação do índice de dano ao DNA nos pacientes com LES por meio do ensaio do cometa e, segundo, a hipótese de que o óleo da polpa de pequi possa proteger as células contra lesões no DNA. Não existem estudos publicados que tenham avaliado o efeito protetor do pequi contra essas lesões nos pacientes com LES.

III. OBJETIVOS

Em pacientes com LES:

- 1) verificar se a suplementação do óleo da polpa de pequi em cápsula reduz as lesões oxidativas no DNA mensuradas por meio do ensaio do cometa;
- 2) verificar se a suplementação do óleo da polpa de pequi em cápsula reduz o colesterol total e a fração lipoproteína de baixa densidade (LDL);
- 3) verificar se a suplementação do óleo da polpa de pequi em cápsula reduz os níveis de proteína C reativa ultra sensível (PCRus);
- 4) verificar se a suplementação do óleo da polpa de pequi em cápsula reduz os níveis de ácido úrico.

Secundário:

- Verificar se os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico têm o índice de dano ao DNA aumentado mensurado por meio do ensaio do cometa em relação a controles saudáveis.

IV. METODOLOGIA DO ESTUDO

4.1. Material e Métodos

a) Causuística

Para a verificação do [índice de dano ao DNA](#) em pacientes com LES (estudo I) foram selecionados 25 pacientes com SLEDAI < 10, diagnosticados conforme os critérios da Colégio Norte Americano de Reumatologia (Hochberg, 1997), no ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) de junho a outubro de 2011. Como controles, foram selecionados 25 indivíduos saudáveis trabalhadores ou estudantes da Universidade de Brasília - UnB. Os pacientes e os controles tinham mais de 18 anos e foram pareados conforme idade, gênero e índice de massa corporal (IMC). Outras variáveis antropométricas também foram aferidas: circunferência da cintura (CC), circunferência do quadril (CQ) e foi calculada a relação cintura/quadril, conforme detalhado no item “e” (página 42). Os critérios de exclusão foram: tabagismo, gravidez, diabetes mellitus, insuficiência renal, infecção ativa, síndrome de Sjogren, angina pectoris, acidente vascular cerebral isquêmico, uso de drogas anti-inflamatórias (somente para controles). Os indivíduos não receberam dieta específica e nem suplementos antioxidantes. Informações demográficas e de estilo de vida foram obtidas a partir de um questionário. O [índice de dano ao DNA](#) dos pacientes e controles foi mensurado por meio do teste do cometa, conforme descrito no item “d”(página 41).

Para a avaliação do efeito [protetor](#) do óleo de pequi em cápsula em pacientes diagnosticados com LES (estudo II), conforme os critérios da Colégio Norte Americano de Reumatologia (Hochberg, 1997), foram captadas 73 pessoas atendidas consecutivamente no ambulatório de Reumatologia do HUB de junho a outubro de 2011. Desses pacientes, foram selecionados 38 indivíduos conforme os critérios de inclusão: diagnóstico de LES, segundo a classificação do Colégio Norte Americano de Reumatologia (Tan e col., 1982) de ambos os gêneros, entre 18 e 60 anos. Foram considerados como critérios de exclusão: pacientes com insuficiência renal (creatinina ≥ 3 mg/dl); com transplante renal prévio; infecção ativa; diabetes mellitus; síndrome de Sjögren, esclerose múltipla, gravidez; doença renal, hepática ou pulmonar (definido como lesão de órgão que necessite de terapêutica imunossupressora ou altas doses de corticosteróides); doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), doenças intestinais malabsortivas, história de angina pectoris típica ou infarto do miocárdio; história prévia de isquemia cerebral transitória; com SLEDAI acima de 10 –

em atividade severa da doença (Nossent, 1998); em uso de drogas para redução de colesterol (nos últimos 3 meses); em uso de prednisona acima de 10 mg/dia, em pulsoterapia com metilprednisolona e/ou em uso de suplementação de multivitaminas. Após exclusão no decorrer da pesquisa conforme os critérios apresentados, foram selecionados 29 pacientes, (Figura 1). As cápsulas utilizadas neste trabalho foram produzidas pela Farmacotécnica a partir do óleo de pequi obtido por extração mecânica a frio, feita por prensa e centrifugação. Após prontas, as cápsulas foram esterilizadas por radiação. Cada uma delas continha 400mg de óleo de pequi.

Ambos os estudos foram aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (UnB), registro do projeto 058/2010, aprovação número 75 em 26/10/12, e todos os indivíduos selecionados autorizaram a realização do estudo por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido ([Apêndice 1](#)).

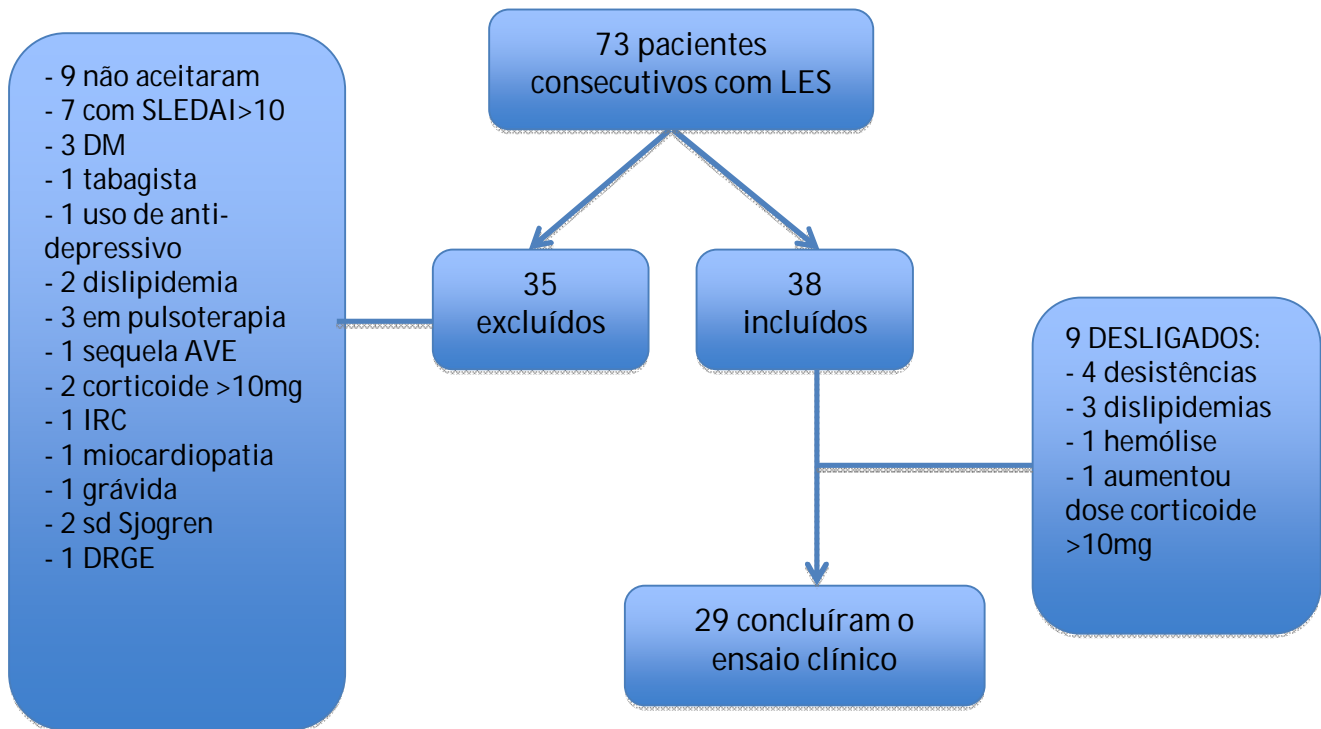


Figura 1: Fluxograma da seleção de pacientes para o estudo II

* SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*; DM: diabetes mellitus; AVE: acidente vascular-encefálico; IRC: insuficiência renal crônica; DRGE: doença do refluxo gastro-esofágico

b) Delineamento dos estudos

O trabalho I consistiu em um estudo transversal em que foi aplicado um questionário para coleta de dados sociais dos pacientes e dos controles, medicamentos em uso e prática de atividade física ([Apêndice 2](#)). O questionário SLEDAI foi aplicado aos pacientes a partir dos exames laboratoriais que eles levaram para a consulta e da avaliação clínica feita pelo médico. Também foram realizadas coleta de sangue para a realização do ensaio do cometa e a avaliação antropométrica dos indivíduos da pesquisa.

O trabalho II foi um ensaio clínico controlado randomizado, cruzado, duplo-cego que consistiu em duas fases (Figura 2). Na primeira etapa, foi feita a randomização por meio da geração de números aleatorizados (<http://www.random.org/>) no dia 22/05/11 às 21:10h. As cápsulas de óleo

de pequi e as cápsulas placebo foram fornecidas pela Farmacotécnica - farmácia de manipulação localizada no Distrito Federal - em caixas separadas: uma continha as embalagens com cápsulas de óleo de pequi e a outra, placebo. Para cada caixa foi atribuída uma cor. O grupo 1 foi definido como cor vermelha e o grupo 2 como cor prateada. No dia de entrega das cápsulas aos pacientes, foi aplicado um questionário para coleta de dados sociais dos pacientes, medicamentos em uso e prática de atividade física ([Apêndice 3](#)). Além disso, foi feito o SLEDAI e o SLICC, também foram realizadas coleta de sangue e urina e a avaliação antropométrica dos pesquisados. Os pacientes ingeriram uma cápsula por dia, contendo 400 mg de óleo de pequi, ou uma cápsula por dia de placebo contendo apenas [dióxido](#) de silicone coloidal - AEROSIL® - durante 60 dias consecutivos. Após esse período, foi realizada uma nova coleta de sangue e urina, uma nova aferição dos parâmetros antropométricos e realizado novamente o SLEDAI.

Foi estabelecido um intervalo de 60 dias antes do início da segunda fase. Após esse intervalo entre as fases, os pacientes da pesquisa trocaram de grupo de modo que aqueles que receberam placebo na primeira fase passaram a receber o óleo de pequi e vice-versa dando início à segunda etapa. Depois da troca de grupos foram realizadas novas coletas de sangue e urina, avaliação antropométrica e novo SLEDAI e foram fornecidas as cápsulas de placebo ou de óleo de pequi. Os pacientes ingeriram uma cápsula por dia durante 60 dias e, após o consumo das 60 cápsulas, foram feitas novas coletas de sangue e urina, antropometria e novo SLEDAI com finalização da participação na pesquisa neste dia.

O período de uso das cápsulas foi definido conforme alguns estudos realizados com antioxidantes em humanos. Um trabalho investigou a ação de isoflavona e ácido fítico em mulheres pós-menopausadas durante 6 semanas (42 dias) no colesterol total e frações e em três marcadores do estresse oxidativo (proteína carbonilada, LDLs oxidada e 8-iso-prostaglandina-F2 α) (Engelman e col., 2005). Outra pesquisa avaliou o efeito antioxidante (por meio do ensaio do cometa e TBARS) de 400 mg de óleo de pequi em cápsula em corredores saudáveis durante 14 dias (Miranda-Vilela e col., 2009a). Dessa forma, optou-se no presente estudo por um período maior que o relatado na literatura, portanto, 60 dias de tratamento com 400 mg de óleo de pequi em cápsula.

Maio a novembro/11

Julho/11 a janeiro/12

Dezembro/11 a julho/12

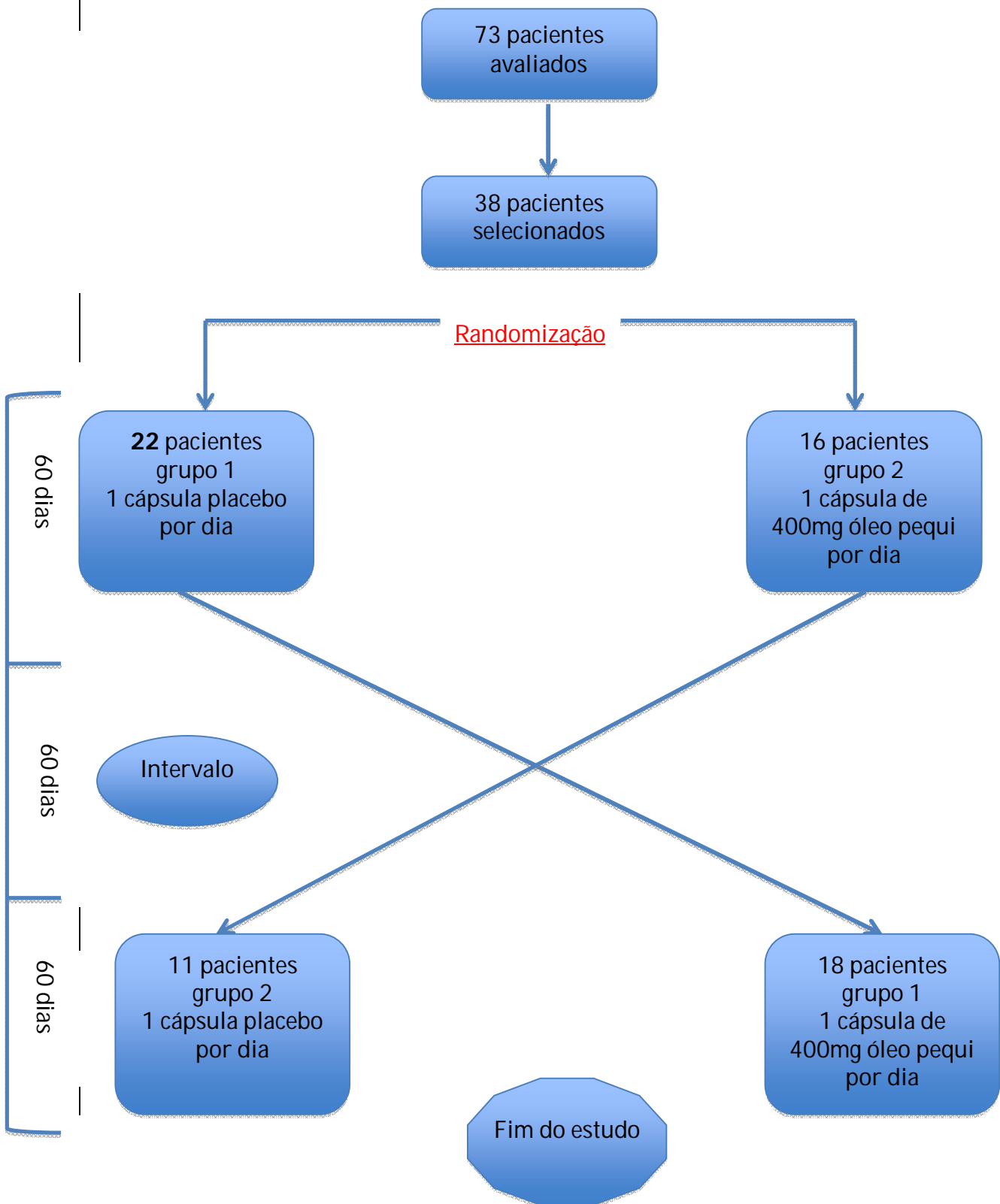


Figura 2: Fluxograma do ensaio clínico randomizado, duplo-cego e cruzado

c) Exames laboratoriais do estudo cruzado

Os exames laboratoriais foram realizados pela manhã após período de repouso e jejum de, no mínimo, oito horas. Os seguintes exames laboratoriais foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do HUB: hemograma completo (sistema automatizado e microscopia, Abbot Cell – Dyn 3700), ureia (urease/GLDH, Abbott Architect C8000), creatinina (reação Jaffé, Abbott Architect C8000), fosfatase alcalina (AMP IFCC, Abbott Architect C8000), gama glutamil transferase - gama GT (nolibdato UV, Abbott Architect C8000), glicose (hexoquinase Abbott Architect C8000), transaminase glutâmico oxalacética - TGO (IFCC sem piridoxal fosfato, Abbott Architect C8000), transaminase glutâmico pirúvica - TGP (IFCC sem piridoxal fosfato, Abbott Architect C8000), complemento C3 (nefelometria, Dade Behring BN II), complemento C4 (nefelometria, Dade Behring BN II), proteína C reativa ultra sensível PCRus (nefelometria, Dade Behring BN II), ácido úrico (uricase/peroxidase, Abbott Architect C8000), colesterol total - CT (esterase/oxidase, Abbott Architect C8000), lipoproteína de baixa densidade - LDL (fórmula de friedewald), lipoproteína de alta densidade - HDL (homogêneo direto, Abbott Architect C8000), lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL (fórmula de friedewald), triglicerídeos - TGL (oxidase/peroxidase, Abbott Architect C8000), proteína total (biureto, Abbott Architect C8000) e frações (albumina – verde de bromocresol, Abbott Architect C8000 e globulina – fórmula simples) e elementos anormais do sedimento – EAS (fita reagente e microscopia). A análise do anti-DNA (imunofluorescência direta DNA dupla hélice) foi feita pelos Laboratórios Sabin de Análises Clínicas.

d) Teste do Cometa

Foi coletado o sangue periférico dos indivíduos do estudo no laboratório de análises clínicas do HUB no período matutino após repouso e jejum de, no mínimo, oito horas. O sangue foi coletado em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e conservado em caixa de isopor contendo gelo durante no máximo quatro horas até o transporte para o Laboratório de Genética Toxicológica (Gtox) do Instituto de Ciências Biológicas (IB), localizado na UnB. O teste do cometa alcalino foi realizado segundo Singh e col. (1988) com pequenas modificações, conforme descrito a seguir. Foi misturado 40µl de sangue à 240µl agarose *low-*

melting [\(anexo 4\)](#) a 0,5% (diluição em tampão salino livre de fosfato – PBS) a 37°C. Esse sangue misturado à agarose *low-melting* foi colocado em três lâminas (triplicata) identificadas contendo agarose normal a 1,5% [\(anexo 4\)](#) e, logo após, colocada suavemente uma lamínula sobre cada lâmina até a solidificação da agarose *low-melting* sob refrigeração (4°C). Após essa etapa, as lâminas foram colocadas em uma solução de lise [\(anexo 4\)](#) detergente fria e recentemente preparada com antecedência de, no mínimo, duas horas e, no máximo, 24h antes do uso. As lâminas ficaram na solução de lise a 4°C por no mínimo duas horas e no máximo 48h antes da eletroforese [\(anexo 4\)](#). Depois desse período, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas lado a lado sem espaço entre elas em uma cuba com solução alcalina (pH ≈13) [\(anexo 4\)](#), com a direção das lâminas padronizada para realização da eletroforese sob refrigeração a 4°C [durante](#) 30 minutos, [seguindo](#) eletroforese [por](#) 30 minutos a 25 volts e 300 miliamperes. A amperagem foi ajustada com a elevação ou a redução do nível de tampão na cuba de eletroforese. Em seguida, as lâminas foram retiradas do tampão de eletroforese e cuidadosamente mergulhadas em solução de neutralização [\(anexo 4\)](#) durante cinco minutos e descanso de cinco minutos fora dessa solução, esse procedimento foi realizado três vezes no total, consecutivamente.

A seguir, as lâminas secaram a temperatura ambiente durante uma a duas horas e, posteriormente, foram mergulhadas em etanol a 100% para fixação durante cinco minutos, depois secaram a temperatura ambiente. Após secas, foram guardadas sob refrigeração a 4°C em caixas abrigadas de luz. Para a leitura das lâminas no microscópio de imunofluorescência Zeiss Axioskop (filtro 510-560 nm, filtro de barreira 590 nm) com ampliação total de 400 vezes, foi colocado 50µl de brometo de etídeo ([solução de uso de](#) 20 µl/ml) [\(anexo 4\)](#), cobertas suavemente, na sequência, com lamínula. Foram classificadas visualmente 100 células de cada amostra, cada célula em uma das cinco classes propostas por Collin e col. (1995). O dano ao DNA foi calculado conforme Jaloszynski e col. (1997). Todas as etapas descritas foram realizadas no escuro, sem a incidência direta de luz.

e) Avaliação Antropométrica

Realizou-se aferição de peso atual em balança digital da marca Filizola®, modelo *Personal Line*, capacidade para 150kg e precisão de 0,1kg com o paciente no centro da plataforma da balança em posição ortostática (indivíduo em pé, na posição ereta com os pés afastados à altura do quadril,

apoiado sobre os dois pés, com os ombros descontraídos e os braços ao lado do corpo) sem se mexer vestindo roupas leves e com os pés descalços.

A estatura foi medida em estadiômetro plano vertical com escala métrica vertical com capacidade 2,10m e precisão de 1mm com a aferição da distância entre o vertex (ponto mais alto do crânio) a região plantar com o observado na posição ortóstica, pés descalços e paralelos e com a cabeça orientada, segundo o plano de Frankfurt (a cabeça é posicionada de modo que a linha imaginária que liga a pálpebra inferior à parte mais alta do lóbulo da orelha esteja paralela em relação ao solo).

O ponto médio do braço foi aferido com uma fita métrica extensível com precisão de 0,1cm e capacidade de 150cm a partir do ponto médio entre o acrômio (ponto mais lateral do ombro na extremidade superior do processo espinhoso da escápula) e o olécrano (ponto mais inferior do braço flexionado) com o cotovelo flexionado e a palma da mão virada para cima e marcado com caneta para possibilitar a medição da circunferência do braço – CB também com a fita métrica em volta do braço estendido e relaxado na horizontal sem apertá-lo e sem deixar folgas do ponto médio citado. A dobra cutânea tricipital – PCT foi tomada na face posterior do braço esticado 1cm acima do ponto médio citado. O adipômetro foi encostado imediatamente abaixo dos dedos que seguram a prega, a leitura foi efetuada após a estabilização da agulha indicadora da escala circular com o adipômetro da marca Lange® com precisão de 1mm. Realizaram-se três mensurações consecutivas, com o cálculo da médias dessas medidas. A circunferência muscular do braço – CMB foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{CMB} = \text{CB} - (0,314 \times \text{PCT})$$

Os percentuais de adequação de CB, PCT e CMB foram calculados multiplicando-se a medida por 100 e dividindo esse resultado pelo percentil 50 de cada medida, conforme a idade e o gênero do indivíduo. Para análise estatística foram considerados quatro parâmetros da classificação conforme Blackburn e Thornton, 1979: desnutrição < 90%, eutrofia entre 90 e 110%, excesso de peso, entre 110 e 120% e obesidade acima de 120%, com a ressalva de que a classificação de CMB vai de desnutrição grave até somente eutrofia a partir de 90%. As circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ) foram aferidas com o indivíduo em posição ortostática, com uma fita métrica extensível com precisão de 0,1 cm com capacidade de 150 cm com a manutenção da fita na posição horizontal no momento da medição, sem apertá-la e sem deixar folgas. A CC foi feita no nível do

umbigo e a CQ foi medida na extensão máxima das nádegas. A medição da CC na altura umbilical foi escolhido por ser a forma mais sensível para detectar obesidade abdominal (Cornier e col., 2011). A relação cintura/quadril foi calculada dividindo-se a medida da cintura pela do quadril. O IMC também designado Índice de Quetelet foi calculado com a divisão do peso pelo quadrado da estatura, e, para análise estatística, considerou-se quatro parâmetros da classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (1995): desnutrição ($<18,5\text{kg/m}^2$), eutrofia (entre $18,5$ a $24,99\text{kg/m}^2$), pré-obesidade (entre 25kg/m^2 a $29,99\text{kg/m}^2$) e obesidade ($> 30\text{kg/m}^2$) (Poirier e col., 2009). Todas as medidas foram realizadas por um único avaliador.

4.2. Métodos Estatísticos

Inicialmente, foi verificado se os dados possuíam distribuição normal por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Depois, foi feita a análise exploratória dos dados, que consistiu na elaboração de tabelas, gráficos e análise descritiva (cálculo de média, mediana, desvio-padrão, correlações, entre outros). Foi verificada a associação entre as variáveis quantitativas da amostra por meio da correlação de Pearson. A comparação entre variáveis quantitativas e qualitativas foi feita por meio de dois testes. Quando havia apenas duas categorias da variável qualitativa foi feito o Teste T de amostras independentes. Quando havia mais de duas categorias da variável qualitativa foi aplicado ANOVA e, em seguida, Tukey. Foi utilizado um modelo de análise de regressão múltipla para verificar se as variáveis independentes qualitativas explicavam determinada variável quantitativa dependente. Foi realizado também o cálculo do poder do teste *post-hoc* para verificar se o tamanho da amostra utilizada nos dois estudos foi suficiente para se detectar uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%. Todas as etapas descritas até aqui foram realizadas por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 e usadas para os dois estudos.

Foi utilizado o programa *Statistical Analysis System* (SAS) para modelagem dos dados do estudo II. Para tanto, aplicou-se a técnica de modelos lineares generalizados com uma única variável dependente para analisar o efeito do tratamento durante o estudo cruzado (*cross-over*). Assim, foram considerados efeitos de: tratamento, período, paciente e, ainda, um efeito residual de tratamento entre as aplicações (*carry-over*). Um p-valor menor que 0,05 foi considerado significativo para todas as análises realizadas.

V. RESULTADOS

5.1. Estudo transversal

No estudo transversal, foram avaliados vinte e três mulheres e dois homens com LES, assim como vinte e três mulheres e dois homens do grupo controle. O nível de dano ao DNA foi significativamente maior nos pacientes com LES que nos controles (Gráfico 1). Para um nível de significância de 5% estimou-se um poder de teste *post-hoc* de 0,99 de se detectar diferenças clinicamente importantes entre os grupos.

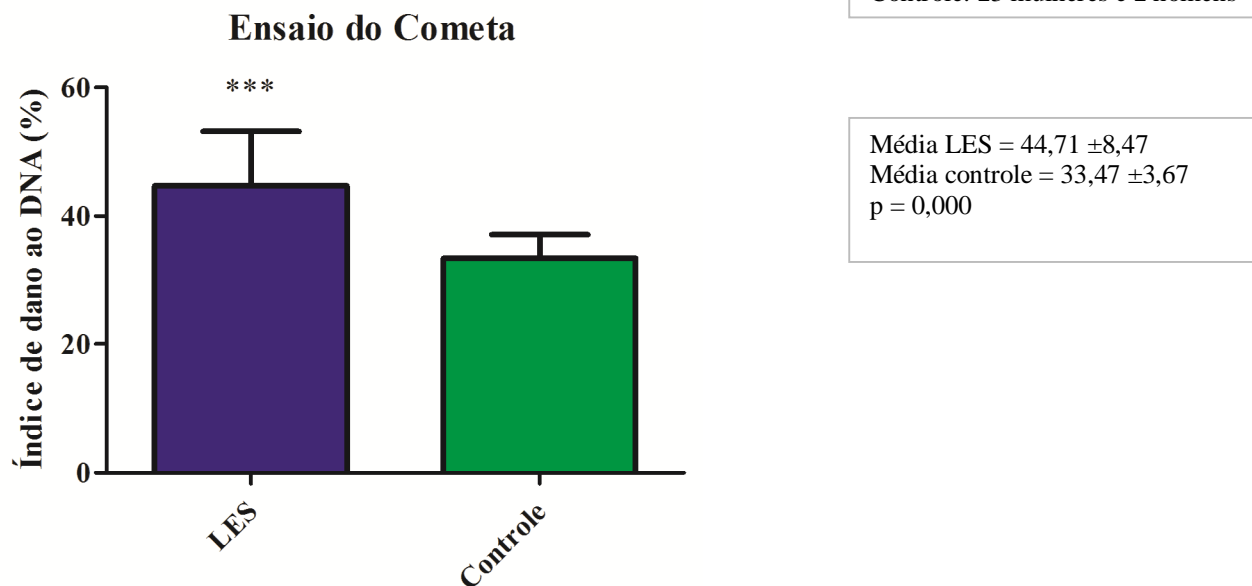


Gráfico 1: Percentual do Índice de dano ao DNA em LES e controle no estudo transversal

As características demográficas e antropométricas, índice de dano ao DNA (%) em ambos os grupos e o SLEDAI em pacientes com LES são mostrados na Tabela 1. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a idade, IMC, CC e CQ (Tabela 1). Todavia, houve diferenças significativas quanto a relação cintura/quadril.

Tabela 1: Características demográficas e antropométricas e percental de índice de dano ao DNA em LES e controle no estudo transversal

Parâmetros	Controles (n = 25) Média+ DP	LES (n = 25) Média+ DP	<u>P-valor</u>
Idade (anos)	33.04 ± 8.99	32.76 ± 8.86	0.912
IMC (kg/m ²)	25.87 ± 7.58	24.84 ± 5.92	0.595
ID (%)	33.47 ± 3.67	44.71 ± 8.46	0.000*
CC (cm)	90.64 ± 18.79	91.41 ± 14.24	0.872
CQ (cm)	105.10 ± 14.59	101,02 ± 11,36	0,303
Relação C/Q	0.85 ± 0,065	0.89 ± 0.054	0.048*
SLEDAI	N/A	3.64 ± 3.25	N/A

*Diferença significativa como $P < 0.05$ do valor correspondente no grupo controle. IMC: índice de massa corporal; ID (%): percentual de índice de dano; CC: circunferência da cintura; CQ: circunferência do quadril; Relação C/Q: relação cintura/quadril; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; N/A: não aplicável.

Características do estilo de vida dos pacientes com LES e controles são mostradas na Tabela 2. Não foi encontrada diferença significativa, considerando atividade física entre os grupos. Entretanto, uma diferença significativa com relação ao consumo de bebida alcoólica foi constatada, 44% do grupo controle declarou-se como etilista social contra apenas 12% dos pacientes com LES. Outras características demográficas estão na Tabela 3. Diferenças significativas podem ser observadas entre os grupos considerando ocupação ($p=0.011$), renda familiar ($p=0.001$) e escolaridade ($p=0.001$). Nenhuma correlação foi observada entre IMC e índice de dano ao DNA (%) ($r=0,046$) e nem entre SLEDAI e índice de dano ao DNA (%) ($r=0,04$). Porém, uma correlação regular significativa ($r=0.337$ $p=0.022$) entre a relação cintura quadril e o índice de dano ao DNA (%) foi encontrada em ambos grupos.

Tabela 2: Características de estilo de vida em LES e controle no estudo transversal

Parâmetros	Controle		LES		P-valor
	(n = 25)		(n = 25)		
	N (%)		N (%)		
	Sim	Não	Sim	Não	
Etilista social	11 (44%)	14 (56%)	3 (12%)	22 (88%)	0.012*
Atividade física	12 (48%)	13 (52%)	11 (44%)	14 (56%)	0.777

*Diferença significativa como $P < 0.05$ do valor correspondente no grupo controle.

Tabela 3. Características demográficas em LES e controle no estudo transversal

Parâmetros		Controle (n = 25) N (%)	LES (n = 25) N (%)	P-valor
Estado civil	Solteiro	16 (64%)	14 (56%)	0.553
	Casado	9 (36%)	10 (40%)	
	Divorciado	0 (0%)	1 (4%)	
Ocupação	Trabalhador	16 (64%)	13 (52%)	0.011*
	Desempregado	0 (0%)	2 (4%)	
	Do lar	0 (0%)	6 (24%)	
	Estudante	3 (12%)	1 (4%)	
	Trabalhador e estudante	6 (24%)	1 (4%)	
	Afastado	0 (0%)	2 (8%)	
Renda familiar	Até 1 salário mínimo	1 (4%)	4 (16%)	0.001*
	De 1 a 2 salários mínimos	2 (8%)	10 (40%)	
	De 2 a 5 salários mínimos	5 (20%)	9 (36%)	
	De 5 a 10 salários mínimos	6 (24%)	2 (8%)	
	De 10 a 20 salários mínimos	6 (24%)	0 (0%)	
	Mais de 20 salários mínimos	5 (20%)	0 (0%)	
Escolaridade	Ensino fundamental	0 (0%)	9 (36%)	0.001*
	Ensino médio	12 (48%)	13 (52%)	
	Ensino superior	7 (28%)	3 (12%)	
	Pós-graduação	6 (24%)	0 (0%)	
Cor da pele	Branca	14 (56%)	10 (40%)	0.209
	Parda	7 (28%)	13 (52%)	
	Negra	4 (16%)	2 (8%)	

*Diferença significativa como $P < 0.05$ do valor correspondente no grupo controle.

5.2. Estudo cruzado

As características demográficas das 29 mulheres do estudo cruzado imediatamente antes de

iniciarem o uso das cápsulas de óleo de pequi ou placebo encontram-se na Tabela 4. A média de idade foi de 33,66 anos (mínimo 20 anos e máximo 54 anos), sendo que 69% das pacientes estavam entre a segunda e a terceira década de vida. A média do IMC foi de 24,05 kg/m² (mínimo 17,26 kg/m² e máximo 43,7 kg/m²). A média da circunferência da cintura (88,82 cm) e 41,4% apresentaram essa medida \geq 88 cm. O tempo médio de doença foi de 7,81 anos. Tanto a média do índice de danos irreversíveis da doença (0,36) quanto a do índice de atividade de doença (3,85) foram baixos. Todavia, o percentual de pacientes com SLEDAI zero (sem atividade de doença) foi de 22,2% e o índice de pacientes com algum grau de dano irreversível de doença (SLICC > 0) foi de 21,4% . A média dos achados laboratoriais e seus valores mínimo e máximo demonstram que as pacientes não apresentavam anemia, comprometimento renal e hepático e não tinham intolerância à glicose. O percentual das pacientes que estavam em leucopenia foi de 6,9%, e linfopenia 17,2%. Nenhuma paciente apresentava plaquetopenia. Com relação ao perfil lipídico, observam-se valores limítrofes quanto a todos os parâmetros, porém, quando se analisa esse perfil em cada paciente, não se detecta dislipidemia. Apenas 20,7% das pacientes apresentaram anti-DNA reagente e 75,9% tinham o exame negativo antes de iniciarem o uso das cápsulas. Com relação aos valores dos complementos, 48,3% das pacientes apresentaram complemento C3 abaixo do valor de referência e apenas 10,3% tiveram complemento C4 abaixo da referência.

Tabela 4: Características demográficas, antropométricas, laboratoriais e da doença das pacientes com LES no estudo cruzado antes de iniciarem o tratamento e o placebo

Características	Média n=29	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
Idade (anos)	33,66	20	54	8,60
Duração da doença (meses)	93,83	6	296	72,62
Idade do diagnóstico	25,83	17	48	7,67
Escolaridade (anos)	10,41	4	17	3,15
Número de medicamentos em uso	3,21	1	7	1,61
SLICC	0,36	0	5	0,98
SLEDAI	3,85	0	10	3,09
Índice de dano ao DNA (%)	43,38	29,50	60,50	7,08
IMC (kg/m ²)	24,05	17,26	43,70	5,51
Circunferência da cintura (cm)	88,82	73,50	135	13,71
Circunferência do quadril (cm)	98,91	82	139	10,55
Relação cintura/quadril	0,87	0,79	0,87	0,048
Adequação CB (%)	101,18%	80,06	146,85	13,35
Adequação PCT (%)	109,26	58,82	204,44	30,87
Adequação CMB (%)	100,04	88,34	129,95	9,24
Hemácias milhões/mm ³	4,56	4,06	5,11	0,31
Hemoglobina g/dl	13,29	11,6	15,10	0,87
Hematócrito %	39,71	34,5	45,4	2,86
VCM	87,07	81,40	92,40	3,22
HCM	29,2	26,70	31,60	1,39
CHCM	33,51	31,30	35,00	0,81
RDW	13,78	11,80	15,20	0,76
Leucócitos %/mm ³	6036	2620	12900	2540
Linfócitos %/mm ³	1952	576	4773	979
Plaquetas mil/mm ³	276413	158000	400000	70483
Creatinina mg/dl	0,65	0,5	1,0	0,095
Uréia mg/dl	24,75	12	50	7,24
Glicose mg/dl	83,35	68	97	8,09
TGO U/l	19,52	14	37	5,12
TGP U/l	16,04	9	27	4,94
Gama GT U/l	26,50	14	41	9,18
Complemento C3 mg/dl	96,18	52,9	159	26,44
Complemento C4 mg/dl	16,74	3,70	42,60	7,83
Ácido úrico mg/dl	3,96	2,50	6,70	1,22
Colesterol total mg/dl	167,61	116	219	25,23
Triglicerídeos mg/dl	113,11	50	251	45,90
HDL mg/dl	45,50	22	69	11,41
LDL mg/dl	99,49	60,40	147,20	22,97
VLDL mg/dl	22,61	10	50	9,16
Proteína total g/dl	7,25	6,30	9,50	0,62
Albumina g/dl	4,20	3,80	4,90	0,25
Globulina g/dl	3,07	2,39	5,10	0,56
Relação albumina/globulina	1,41	0,86	1,89	0,25
PCRus mg/dl	0,30	0,09	1,5	0,32

SLICC: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*; SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*; IMC: índice de massa corporal; CB: circunferência braço; PCT: prega cutânea triptal; CMB: circunferência muscular do braço; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width*; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; Gama GT: gama glutamil transferase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; PCRus: proteína C reativa ultra sensível

A Tabela 5 mostra as características socioeconômicas das pacientes do estudo cruzado. A maioria delas é solteira (55,2%), trabalha (51,7%), tem renda familiar entre 1 e 5 salários mínimos (69%), concluiu o ensino médio (55,2%) e não pratica nenhuma atividade física (72,4%). A classificação de atividade física foi realizada conforme *The American College of Sports Medicine* (Oeser e col., 2005).

Tabela 5: Características socioeconômicas das pacientes com LES no estudo cruzado

Características	Percentual(%)
Estado civil	
Solteira	55,2
Casada ou em união estável	37,9
Divorciada	6,9
Ocupação	
Trabalhadora	48,3
Desempregada	3,4
Do lar	27,6
Estudante	13,8
Trabalhadora e estudante	3,4
<u>Em licença médica</u>	3,4
Renda familiar	
Até 1 salário mínimo	17,2
1 a 2 salários mínimos	27,6
2 a 5 salários mínimos	41,4
5 a 10 salários mínimos	13,8
Escolaridade	
Ensino fundamental	31
Ensino médio	55,2
Ensino superior	10,3
Pós-graduação	3,4
Cor da pele	
branca	44,8
parda	44,8
negra	10,3
Atividade física	
Nenhuma	72,4
< 3 x/sem e/ou < 30 min/sessão	6,9
≥ 3x/sem e/ou ≥ 30 min/sessão	20,7

O Gráfico 2 trata da classificação dos parâmetros nutricionais. Apenas quanto adequação de PCT, a maioria das pacientes foi classificada em pré-obesidade e obesidade (51,7%). Nos outros parâmetros, a maioria delas foi classificada em eutrofia: IMC (65,5%), adequação de CB (58,6%) e adequação de CMB (82,8%). É importante destacar que a adequação de CMB não tem classificação

de pré-obesidade e obesidade, pois refere-se apenas ao compartimento muscular do braço.

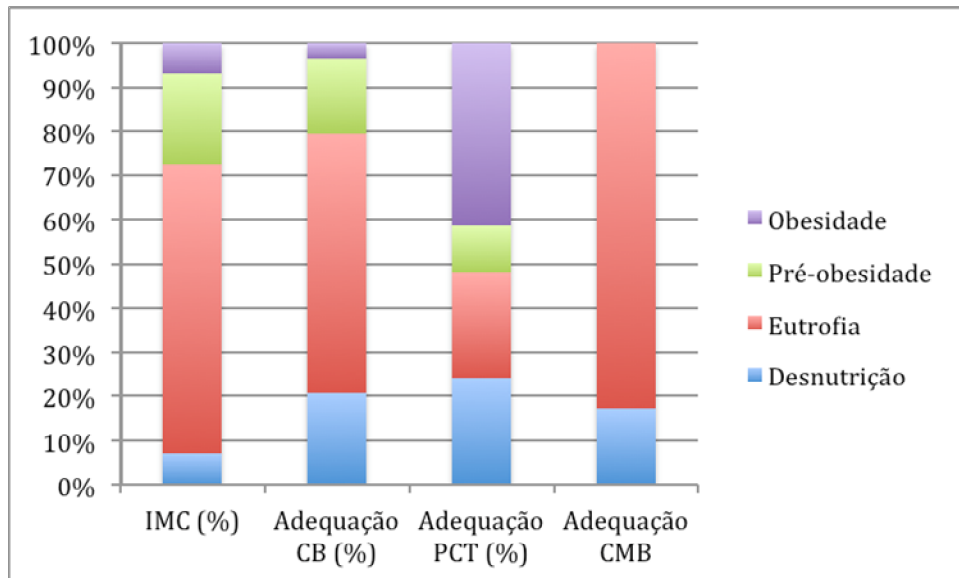


Gráfico 2: Características antropométricas das pacientes com LES no estudo cruzado

O medicamento mais utilizado pelas pacientes do estudo foi a hidroxicloroquina ou difosfato de cloroquina (89,7%), seguido da prednisona (72,4%) e azatioprina (34,5%), conforme mostra a Tabela 6. Apenas duas pacientes utilizavam metotrexate e amitriptilina. Das 21 pacientes que utilizavam prednisona, a média da dose foi de 4,9 mg (DP 0,56).

Tabela 6: Perfil do uso de medicamentos pelas pacientes com LES no estudo cruzado

Uso do medicamento	N	%	Dose média
Cloroquina	26	<u>89,7</u>	<u>174mg (difosfato)/dia</u>
Prednisona	21	<u>72,4</u>	<u>4,9mg/dia</u>
Azatioprina	10	<u>34,5</u>	<u>100mg/dia</u>
Metotrexate	2	<u>6,9</u>	<u>8,75mg/semana</u>
Amitriptilina	2	<u>6,9</u>	<u>25mg/dia</u>
Isoniazida	1	<u>3,4</u>	<u>300mg/dia</u>
Ácido fólico	2	<u>6,9</u>	<u>3mg/semana</u>
Fluoxetina	1	<u>3,4</u>	<u>20mg/dia</u>
Carbamazepina	1	<u>3,4</u>	<u>200mg/dia</u>
Carbonato de cálcio	4	<u>13,8</u>	<u>N/D</u>
Vitamina D	7	<u>24,1</u>	<u>N/D</u>
Anlodipina	1	<u>3,4</u>	<u>5mg/dia</u>
Contraceptivo oral	2	<u>6,9</u>	<u>N/D</u>
Ácido acetil salicílico	1	<u>3,4</u>	<u>100mg/dia</u>
Propanolol	1	<u>3,4</u>	<u>80mg/dia</u>
Enalapril	3	<u>10,3</u>	<u>40mg/dia</u>
Nifedipina	1	<u>3,4</u>	<u>20mg/dia</u>
Levotiroxina	4	<u>13,8</u>	<u>101,7mg/dia</u>
Atenolol	1	<u>3,4</u>	<u>100mg/dia</u>
Alendronato	1	<u>3,4</u>	<u>70mg/semana</u>

N/D: não disponível.

Foram realizados testes de correlação de Pearson (coeficiente = r) entre índice de dano ao DNA (%) e idade, tempo de diagnóstico, idade de diagnóstico, escolaridade (em anos), SLICC, SLEDAI, IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril, relação cintura/quadril, % adequação de CB, PCT e CMB, PCRus, ácido úrico, glicose, gama GT, colesterol total e frações, proteína total e frações. A única correlação encontrada foi entre o índice de dano ao DNA (%) e HDL ($r = -0,414$, $p = 0,029$), como se pode observar no Gráfico 3. Conforme essa correlação, quanto maior o HDL, menor o índice de dano ao DNA (%).

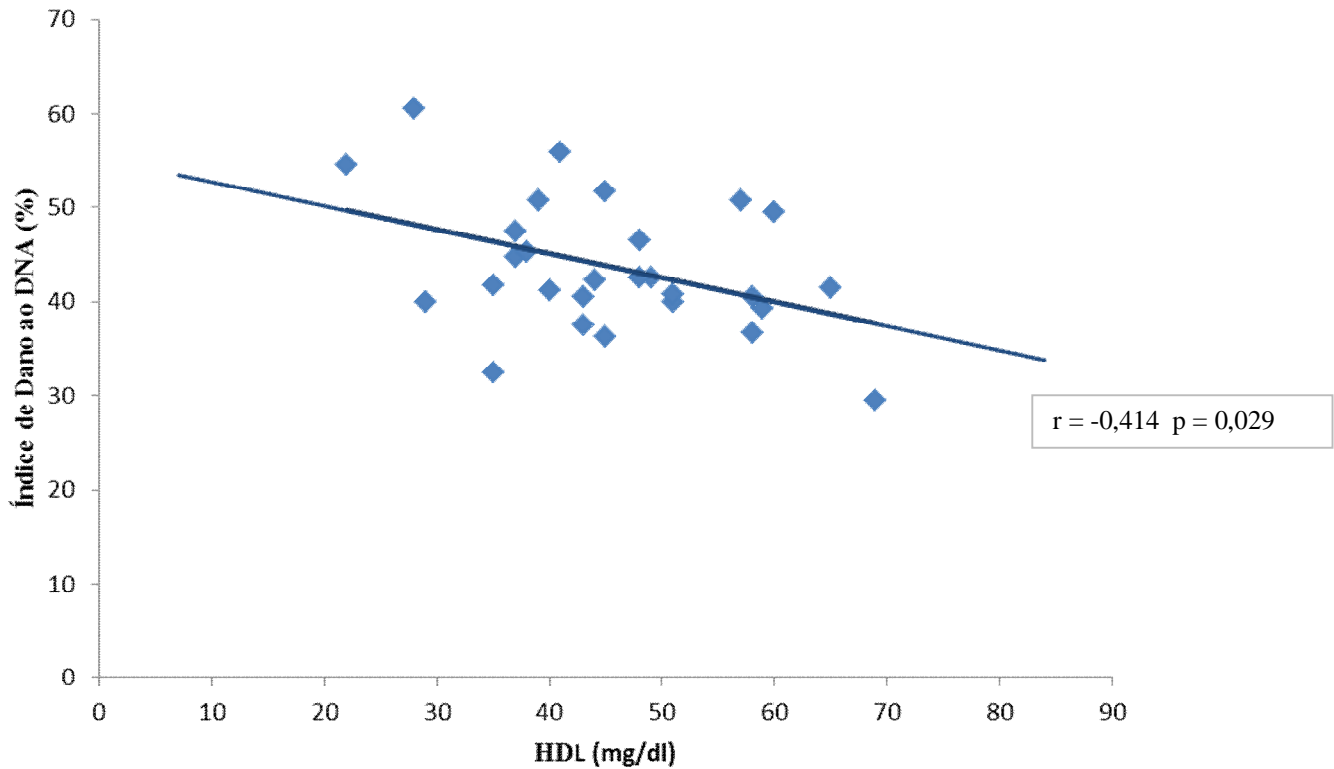


Gráfico 3: Correlação entre Índice de dano ao DNA e HDL no estudo cruzado

Não foi constatada correlação entre PCRus e as variáveis quantitativas: idade, idade de diagnóstico, duração de doença, escolaridade em anos, SLICC, SLEDAI, IMC, adequação de CB, PCT e CMB, CC, CQ, relação CQ, glicose.

Foram realizados teste de correlação de Pearson também para IMC e idade, idade de diagnóstico, duração da doença, escolaridade em anos, SLICC, SLEDAI, dose de prednisona. Foi encontrada uma correlação inversa entre IMC e anos de estudo ($r = -0,537$, $p = 0,03$), quanto mais anos estudados, menor o IMC, conforme pode-se observar no Gráfico 4.

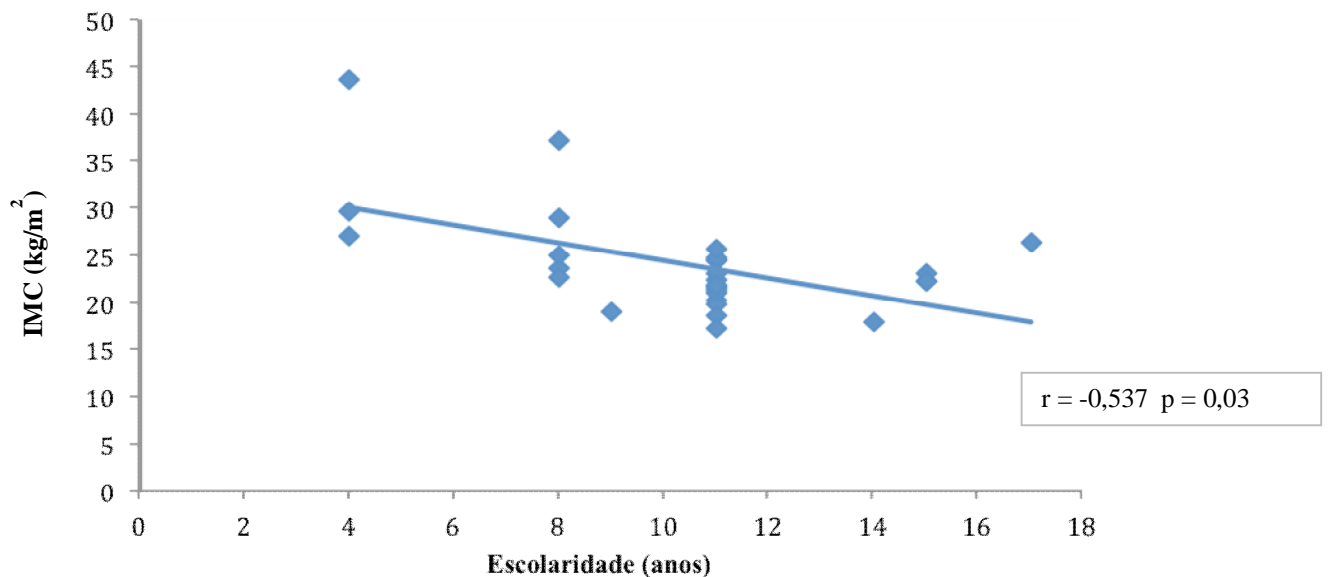


Gráfico 4: Correlação entre IMC e Escolaridade no estudo cruzado

Quando se comparou as médias do índice de dano ao DNA (%) entre as várias variáveis qualitativas (medicamentos em uso, estado civil, renda familiar, cor da pele, ocupação, nível de escolaridade, atividade física, classificação dos parâmetros nutricionais e anti-DNA reagente), detectou-se uma diferença significativa ($p = 0,045$) entre os praticantes de atividade física (média %ID = 39,1) e os não-praticantes (média %ID = 44,9), conforme mostra o Gráfico 5. Outra diferença significativa ($p = 0,006$) constatada foi entre os usuários de vitamina D (média %ID = 37,2) e os não usuários (média %ID = 45,3), segundo o Gráfico 6. Contudo, não foi encontrada significância estatística entre as médias de PCRus entre as mesmas variáveis qualitativas.

Foi utilizado um modelo de análise de regressão múltipla para verificar se as variáveis independentes: ocupação, renda familiar, escolaridade, prática de atividade física, uso de azatioprina, prednisona, cloroquina, ácido fólico e vitamina D explicam a variável índice de dano ao DNA. Como as únicas variáveis independentes que tiveram significância estatística foram prática de atividade física e uso de vitamina D, foi analisado se uma tinha influência sobre a outra com relação ao índice de dano ao DNA e constatou-se não houve essa interferência. Entretanto, essas duas variáveis independentes explicam 38,53% da variação total do índice de dano ao DNA. Dessa forma, as pacientes desse estudo não praticantes de atividade física apresentaram índice de dano ao DNA 5,71% maior que àquelas praticantes. Além disso, pacientes não usuárias de vitamina D

apresentaram índice de dano ao DNA 7,97% maior que àquelas usuárias. As outras variáveis independentes não tiveram relevância estatística e, por isso, foram retiradas do modelo.

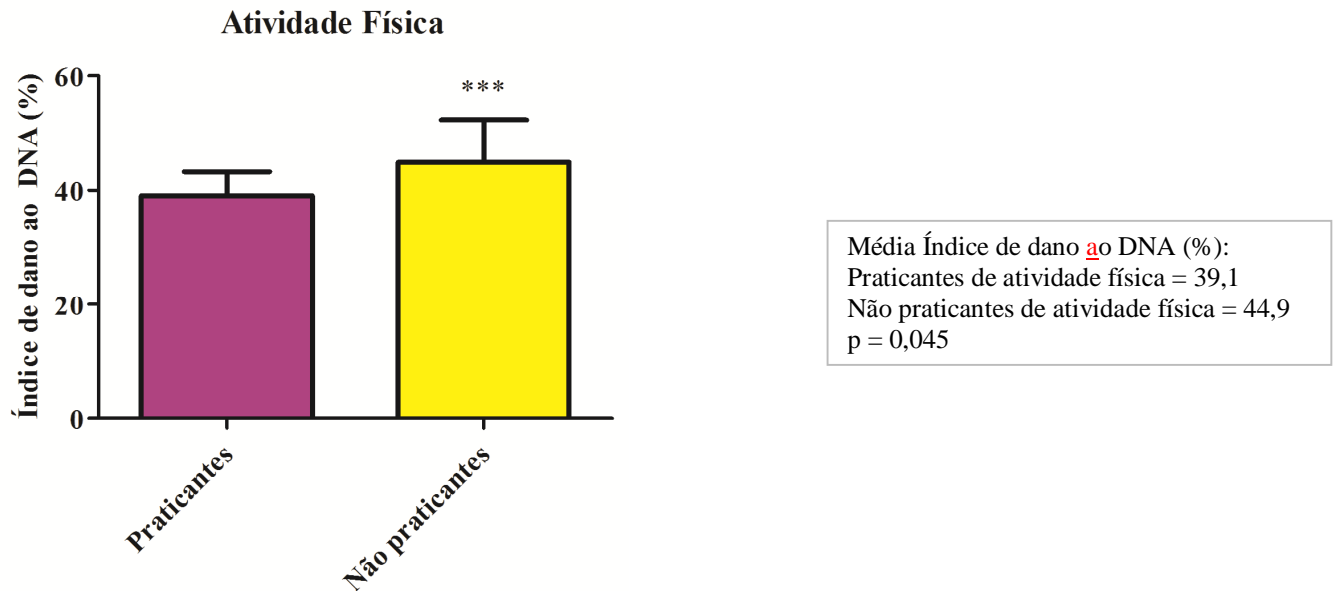


Gráfico 5: Percentual do Índice de dano ao DNA em pacientes com LES praticantes e não praticantes de atividade física no estudo cruzado

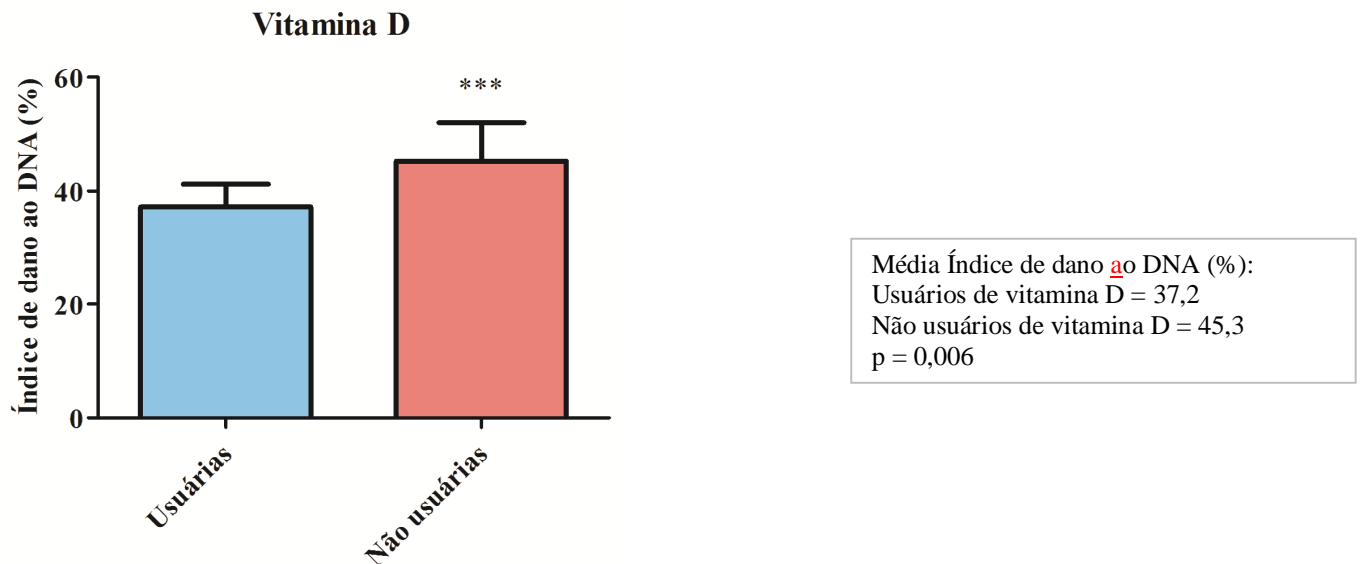


Gráfico 6: Percentual do Índice de dano ao DNA em usuárias e não usuárias de vitamina D no estudo cruzado

Foram analisados os parâmetros antropométricos, índice de dano ao DNA (%), marcadores inflamatórios e perfil lipídico das pacientes com LES antes e depois do tratamento após a finalização do estudo cruzado, conforme mostra a Tabela 7. Os dados foram analisados considerando-se o efeito do paciente como aleatório. Esse teste não evidenciou efeito significativo de tratamento para nenhuma variável analisada, exceto para PCRus ($p = 0,0161$). Assim, com o uso das cápsulas de óleo de pequi, houve uma redução significativa da PCR estatisticamente maior que a diminuição ocorrida com o uso do placebo. Para um nível de significância de 5% estimou-se um poder de teste de *post-hoc* para o índice de dano ao DNA de 0,9887; para a relação cintura/quadril de 0,9999 e para a PCRus de 1,0000 de se detectar diferenças clinicamente importantes entre os tratamentos (óleo de pequi e placebo).

Tabela 7: O efeito do óleo de pequi em relação ao placebo nas pacientes com LES sobre diversas variáveis

<u>Variáveis**</u>	<u>Δ (inicial – final)</u>	<u>Diferença entre grupos</u>		<u>P - valor</u>
	<u>Grupo</u>	<u>Óleo de pequi</u>	<u>Placebo – óleo de pequi</u>	
	<u>Placebo</u>			
Índice de Dano	<u>0,54 ± 1,45</u>	<u>1,68 ± 1,45</u>	<u>-1,42 ± 1,74</u>	<u>0,5818</u>
SLEDAI	<u>0,12 ± 0,81</u>	<u>-1,01 ± 0,88</u>	<u>1,12 ± 1,14</u>	<u>0,3598</u>
IMC	<u>0,13 ± 0,11</u>	<u>0,15 ± 0,11</u>	<u>-0,02 ± 0,14</u>	<u>0,8884</u>
CC	<u>0,47 ± 0,64</u>	<u>-0,01 ± 0,64</u>	<u>0,48 ± 0,73</u>	<u>0,5994</u>
CQ	<u>0,28 ± 0,42</u>	<u>0,73 ± 0,44</u>	<u>-0,45 ± 0,60</u>	<u>0,4632</u>
Relação C/Q	<u>0,00 ± 0,01</u>	<u>-0,00 ± 0,01</u>	<u>0,01 ± 0,01</u>	<u>0,4626</u>
Adequação CB	<u>-0,01 ± 0,54</u>	<u>0,46 ± 0,54</u>	<u>-0,47 ± 0,74</u>	<u>0,5460</u>
Adequação PCT	<u>1,24 ± 1,87</u>	<u>3,43 ± 1,87</u>	<u>-2,18 ± 2,65</u>	<u>0,4164</u>
Adequação CMB	<u>-0,24 ± 0,70</u>	<u>-0,47 ± 0,70</u>	<u>0,23 ± 1,00</u>	<u>0,8172</u>
Glicose	<u>-0,59 ± 3,21</u>	<u>1,03 ± 2,01</u>	<u>-1,62 ± 3,23</u>	<u>0,6805</u>
TGO	<u>-0,14 ± 1,33</u>	<u>-0,81 ± 1,27</u>	<u>0,67 ± 1,79</u>	<u>0,7192</u>
TGP	<u>0,48 ± 1,47</u>	<u>-0,85 ± 1,40</u>	<u>1,33 ± 1,99</u>	<u>0,5180</u>
Gama GT	<u>-6,07 ± 2,00</u>	<u>-3,98 ± 1,28</u>	<u>-2,08 ± 2,38</u>	<u>0,4092</u>
PCR us	<u>-0,07 ± 0,06</u>	<u>0,15 ± 0,06</u>	<u>-0,22 ± 0,08</u>	<u>0,0161*</u>
Ácido úrico	<u>0,41 ± 0,25</u>	<u>0,06 ± 0,19</u>	<u>0,34 ± 0,26</u>	<u>0,2963</u>
Colesterol total	<u>2,74 ± 3,50</u>	<u>-3,26 ± 3,42</u>	<u>5,70 ± 4,76</u>	<u>0,2339</u>
Triglicerídeos	<u>12,71 ± 5,84</u>	<u>-0,03 ± 5,71</u>	<u>12,75 ± 7,88</u>	<u>0,1327</u>
HDL	<u>0,13 ± 1,36</u>	<u>-2,25 ± 1,32</u>	<u>2,38 ± 1,84</u>	<u>0,2218</u>
LDL	<u>0,15 ± 3,23</u>	<u>-0,90 ± 3,15</u>	<u>1,05 ± 4,37</u>	<u>0,8190</u>
VLDL	<u>2,44 ± 1,49</u>	<u>0,01 ± 1,22</u>	<u>2,43 ± 1,56</u>	<u>0,1440</u>
Globulina	<u>-0,02 ± 0,08</u>	<u>-0,01 ± 0,07</u>	<u>-0,01 ± 0,10</u>	<u>0,9280</u>

SLEDAI: ; IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; CQ: circunferência do quadril; Relação C/Q: relação cintura/quadril; CB: circunferência do braço, PCT: prega cutânea tricipital; CMB: circunferência muscular do braço; TGO: transaminase glutâmico oxalacética ; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; Gama GT: gama glutamil transferase; PCRus: proteína C reativa ultra sensível; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; *p-valor com significância estatística: **valores expressos em média de mínimos quadrados ± erro padrão.

VI. DISCUSSÃO

6.1. Estudo transversal

A grande diferença observada entre os pacientes com LES e o grupo controle em relação ao índice de dano ao DNA (%) pode ser explicada pelo persistente estado de estresse oxidativo encontrado nesses pacientes mesmo com baixa ou média atividade de doença (Lozovoy e col., 2011). O poder do teste post-hoc (0,99) mostra que o tamanho da amostra foi suficiente para detectar diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%. Vários estudos têm demonstrado um aumento no estresse oxidativo em pacientes com LES, pelo uso de marcadores oxidantes e anti-oxidantes. Lozovoy e colaboradores (2011) evidenciaram um aumento de hidroperóxidos lipídicos e redução dos níveis de antioxidante em pacientes com LES. Zhang e colaboradores (2010) também confirmaram a presença de estresse oxidativo nesse tipo de paciente por meio de vários marcadores de oxidação proteica. Outro estudo mostrou aumento significativo no estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes lúpicos o que sugere um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os mecanismos de defesa antioxidante em LES (Wang e col., 2010).

O presente trabalho é o primeiro a utilizar o ensaio do cometa para avaliar o estresse oxidativo em pacientes com LES. Os outros estudos descritos na literatura avaliaram esse estado por outros métodos, inclusive níveis urinários de 8-epi-PGF2 α (Keaney e col., 2003), oxidação proteica e lipídica e níveis de óxido de nitrogênio (Lozovoy e col., 2011), níveis plasmáticos de TBARS (Furukawa e col., 2004), níveis urinários de isoprostanos (Avalos e col., 2007) e níveis sanguíneos de MDA e grupo sulfidril (SH) (Pérez e col., 2012). O teste do cometa é um método rápido, de baixo custo, simples, sensível, requer um baixo número de células para análise e é flexível: podem ser realizadas diferentes condições de eletroforese para se detectar diferentes tipos e níveis de dano ao DNA. O ensaio do cometa alcalino, utilizado no presente estudo, permite a detecção de quebras de fita dupla e simples no DNA e outros tipos de danos, como sítios lábeis alcalinos (Wong e col., 2005).

Esse estado de estresse oxidativo detectável por vários métodos diferentes pode ser influenciado pela adiposidade. Um estudo mostrou uma associação positiva significativa entre índices de obesidade, como IMC e relação cintura/quadril, e marcadores do estresse oxidativo na

população em geral (Keaney e col., 2003). A associação entre a relação cintura/quadril e o estresse oxidativo também foi demonstrada em mulheres pós-menopausadas por outro trabalho (Crist e col., 2009). Dessa forma, a gordura abdominal pode induzir um maior nível de estresse oxidativo que o teor de gordura total, mas nenhum estudo foi conduzido nesse sentido em pacientes com LES. Assim, a correlação entre a relação cintura/quadril e o índice de dano ao DNA (%) demonstrada na corrente pesquisa transversal corrobora os estudos citados. Não foi realizada nenhuma estratificação quanto a gênero já que havia apenas dois homens em cada grupo.

Apesar da obesidade estar associada com o estado de estresse oxidativo (Keaney e col., 2003; Furukawa e col., 2004), não foi demonstrada a associação entre IMC e índice de dano ao DNA (%) no corrente estudo transversal. Além disso, a obesidade é comum nos pacientes com LES e é independentemente associada aos marcadores inflamatórios aumentados (Oeser e col., 2005), por isso pode favorecer o aumento do estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica e LES (Lozovoy e col., 2011). Essa relação pode não ter sido encontrada no presente trabalho devido à específica amostra de pacientes com LES sem nenhuma outra doença crônica.

Outro aspecto que pode afetar o estresse oxidativo é o exercício físico (Florencio e col., 2011). Por isso, o fato de não se ter encontrado diferença significativa entre a prática de atividade física entre os grupos é importante. Por outro lado, informações sobre o tipo de exercício físico assim como sua duração e frequência não foram coletadas. Mesmo assim, o grupo de pacientes com LES teve um maior índice de dano ao DNA que o controle, o que destaca a possível associação do estresse oxidativo aumentado com a doença.

A condição socioeconômica também pode influenciar esse estado de estresse oxidativo. Um status socioeconômico baixo está associado à uma maior oxidação e níveis mais baixos de nutrientes antioxidantes (Janicki-Deverts, 2009), assim a diferença significativa observada entre os grupos relacionada à ocupação, renda familiar e escolaridade é relevante. Portanto, um baixo *status* socioeconômico pode aumentar o desequilíbrio do estado oxidante/antioxidante.

Já, a associação entre atividade de doença e estresse oxidativo é contraditória na literatura. Neste estudo transversal, não foi encontrada uma correlação entre SLEDAI e o índice de dano ao DNA (%), possivelmente porque os pacientes incluídos nessa pesquisa tinham SLEDAI menor que dez. Hassan e colaboradores (2011) encontraram uma correlação

entre marcadores do estresse oxidativo (MDA, GSH e GSHPx) e atividade de doença em pacientes com LES. Outro estudo demonstrou uma forte resposta de marcadores do estresse oxidativo/nitrosativo em pacientes com alto SLEDAI (Wang e col., 2010). Em contraste, Lozovoy e colaboradores (2011) analisaram oxidação proteica e lipídica e níveis de óxido de nitrogênio e não verificaram essa correlação. Seus pacientes com LES tinham nenhuma, baixa ou média atividade de doença e foram pareados quanto a IMC com o grupo controle exatamente como o presente trabalho. Outros dois estudos afirmaram que o estresse oxidativo não foi correlacionado com o SLEDAI (Avalos, 2007; Pérez ecol., 2012).

Dessa forma, o estudo transversal demonstrou por meio do ensaio do cometa que os pacientes com LES têm um desequilíbrio no sistema oxidante/antioxidante, independentemente do nível de atividade de doença. Além disso, os resultados da correlação entre a relação cintura/quadril e o índice de dano ao DNA (%) sugerem que a redução da gordura abdominal nesses pacientes deve ser aconselhada com o intuito de reduzir o estresse oxidativo.

6.2. Estudo cruzado

A média de idade do estudo cruzado (33,66 anos) é semelhante a dois trabalhos, sendo um deles brasileiro (32,9 anos) (Bezerra e col., 2005; Zhu e col., 2010). O percentual de pardos (44,8%), negros (10,3%) e brancos (44,8%) também foi bem semelhante ao estudo de Natal/RN, pardos 42,7%, negros 7,3% e brancos 41,5% (Bezerra e col., 2005). Entretanto, a miscigenação ocorrida no Brasil torna difícil a correta classificação racial. A média da idade do diagnóstico (25,83 anos) foi semelhante a dois estudos 27 anos (Sella e Sato, 2004) e 28,7 anos (Santos, 2010). Já a média da duração da doença na literatura variou entre 65,6 a 134,1 meses (Bezerra, 2005; Santos, 2010; Sella e Sato, 2004; Oeser e col., 2005; Cardoso e col., 2008; Chaiamnuay e col., 2007), estando o resultado encontrado no presente estudo cruzado (93,83 meses) dentro dessa faixa.

O percentual de pacientes deste estudo em leucopenia (6,9%) e linfopenia (17,2%) foi bem inferior ao apresentado na literatura: 42,7% e 40,9% respectivamente (Bezerra e col., 2005), possivelmente devido à determinação de alta atividade de doença (SLEDAI > 10) como fator de exclusão. Já a média de PCRus no presente trabalho (3mg/l) foi semelhante ao identificado por Lee e colaboradores (2008) (2,1mg/l), mas menor que o observado em outro estudo (11,6mg/l) (Santos e

col., 2012). A média do SLICC neste trabalho (0,36) foi inferior à média da literatura (Santos, 2010, Sella e Sato, 2004; Hassan, 2011), assim como a média do SLEDAI (3,85) (Cardoso e col., 2008; Hassan, 2011). O menor valor de SLEDAI na corrente pesquisa já era esperado, pois a alta atividade de doença foi definida como fator de exclusão. Todavia, o índice de pacientes com SLEDAI zero no presente estudo cruzado (22,2%) foi inferior à literatura (47,6%) (Cardoso e col., 2008). Já o percentual de pacientes com algum grau de dano irreversível do corrente trabalho (21,4%) está dentro da grande variação (9,4% a 72%) encontrada em outras pesquisas (Sella e Sato, 2004). O percentual de pacientes em uso de corticosteroide (72,4%) foi muito semelhante a um estudo nacional (73%), porém o uso de cloroquina (89,7%) foi bem maior que esse mesmo trabalho brasileiro (61,7%) (Santos, 2010) e superior também a uma pesquisa coreana (68,7%) (Lee e col., 2008). A média da dose de corticoide deste estudo cruzado foi bem inferior ao descrito no estudo de Hassan e colaboradores (2011) (18,5mg/dia), no entanto, bem semelhante a outro trabalho (4,75mg/dia) (Lee e col., 2008). O percentual de pacientes com anti-DNA reagente (20,7%) foi menor também devido a determinação da baixa atividade de doença como fator de inclusão (Hassan, 2011).

Atualmente, o distúrbio nutricional mais comum em pacientes com LES é o excesso de peso (Santos, 2010) que tem sido associado independentemente ao aumento da inflamação (Oeser e col., 2005). Todavia, o percentual de pacientes com LES acima do peso (classificados em sobrepeso e obesidade) quanto IMC antes de iniciarem o uso das cápsulas (placebo ou pequi) foi menos de 30% bem inferior à vários estudos 76,5% (Zhu e col., 2010), 67% (Oeser e col., 2005), 56% (Chaiamnuay e col., 2007), 51,9% (Cardoso e col., 2008).

Entretanto, é importante observar que indivíduos classificados como eutróficos quanto ao IMC podem necessitar de uma classificação mais detalhada para definir seu risco relacionado à adiposidade. Há limitações quanto ao uso do IMC isoladamente para avaliar o tecido adiposo, principalmente em adultos com $IMC \leq 30\text{kg/m}^2$. Esse índice não distingue tecido adiposo de massa muscular (Cornier e col., 2011). Dessa forma, quando se observa a adequação de PCT, verifica-se que 51,5% das pacientes deste estudo cruzado foram classificadas como acima do peso (pré-obesidade e obesidade), um valor bem superior à classificação dada pelo IMC. Infelizmente não há dados de classificação do estado nutricional quanto a PCT em pacientes com LES na literatura disponíveis para serem comparados com o presente trabalho. Outro parâmetro que auxilia na

classificação do estado nutricional é a circunferência da cintura e, neste estudo, cerca de ¼ das pacientes apresentaram essa medida maior que 88 cm, valor que indica um risco elevado de complicações metabólicas associadas à obesidade.

Ainda com relação à adiposidade, alguns trabalhos com populações saudáveis demonstraram a estreita ligação entre acúmulo de tecido adiposo e estresse oxidativo mensurado por vários métodos: teor de MDA sérico (Sankhla e col., 2012), CAOT (Tabur e col., 2009), TBARS e 8-epi-prostaglandin-F2 α urinário (Furukawa, 2004); 8-epi-prostaglandin-F2 α urinário (Keaney, 2003); MDA plasmático, cobre-zinco SOD, GPX (Olusi, 2002). Todavia, a mesma associação não foi encontrada no presente estudo, talvez em consequência do baixo SLEDAI desta população.

Possivelmente também por isso não se tenha demonstrado uma correlação entre IMC e SLEDAI no atual trabalho, o que corrobora com o estudo de Oeser (2005) e vai contra o trabalho de Zhu e col. (2010).

Além disso, assim como no estudo transversal, não houve correlação significativa entre os danos ao DNA e SLEDAI neste trabalho com desenho experimental cruzado. Outra pesquisa feita por meio do marcador isoprostano F₂ (Avalos e col., 2007) também não encontrou relação entre essas duas variáveis. No entanto, diferente do que foi encontrado em outros estudos por meio de diferentes métodos como MDA (Hassan, 2011), proteína carbonilada e 3-nitrotirosina (Zhang, 2009).

Por outro lado, foi detectada uma correlação inversa entre índice de dano ao DNA (%) e HDL no presente estudo, reportada também em outros trabalhos. Um estudo comparou indivíduos com CT, LDL, TGL e glicemia normais, porém com HDL reduzido com controles normolipidêmicos e verificou que os primeiros tiveram um elevado estresse oxidativo (mensurado por 8-isoprostanos no plasma) (Kontush e col., 2005). O HDL plasmático tem potente atividade antioxidante que pode ocorrer da sinergia na inativação de lipídios oxidados do LDL por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Kontush e col., 2003). E ainda, foi demonstrada uma correlação inversa entre IMC e anos de estudo, o que corrobora com a literatura e significa um IMC maior em pessoas com menores níveis educacionais (Johnson e col., 2011; Sanchez-Vaznaugh e col., 2008). Tem sido sugerido que essa associação existe porque as condições ambientais associadas ao baixo nível educacional limitam o conhecimento de alimentos nutritivos e de meios seguros para a prática de exercício físico o que provoca uma desregulação metabólica e um maior

acúmulo de calorias (Johnson e col., 2011).

A diferença significativa entre as médias de índice de dano ao DNA (%) de praticantes e não praticantes de atividade física mostra o efeito protetor da atividade física contra o estresse oxidativo. Já está bem documentado na literatura que o exercício físico regular resulta em adaptações na capacidade antioxidante o que protege as células contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo e previne danos celulares subsequentes (Florêncio, 2011). Foi comprovado que a atividade física está associada com a redução de marcadores do estresse oxidativo em roedores (Gozal e col., 2011), exerce um efeito modulador no equilíbrio antioxidante em mulheres (Covas e col., 2002), aumenta a CAOT e reduz a circunferência da cintura em mulheres obesas (Hen e col., 2010). Entretanto, o atual estudo é pioneiro em demonstrar essa relação em pacientes lúpicas.

As pacientes com LES que estavam em uso de vitamina D apresentaram um índice de dano ao DNA (%) significativamente menor que aquelas não usuárias. Essa informação indica que a suplementação com vitamina D pode reduzir o estresse oxidativo em pacientes com LES. Esse fato já foi sugerido por um estudo, porém, com negros americanos diabéticos tipo 2 (Jain e col., 2012). Um outro estudo avaliou o *status* de vitamina D e marcadores do estresse oxidativo em idosos que apresentavam o metabolismo da glicose comprometido e obteve como resultado uma associação inversa entre esses dois parâmetros (Gradinaru, 2012), o que demonstra um efeito antioxidante dessa vitamina. Não há relatos de estudos clínicos na literatura que mostram essa relação com pacientes com LES, todavia o efeito protetor da vitamina D contra o estresse oxidativo nesses pacientes já foi relatado (Vinh Quóc e Nguyễn, 2012). A análise de regressão múltipla feita com as variáveis independentes qualitativas e o índice de dano ao DNA mostra que apenas a atividade física e a vitamina D tiveram um efeito conjunto sobre esse índice.

Não foi encontrada uma ligação entre PCRus e as várias variáveis qualitativas e quantitativas descritas nos resultados deste trabalho em contraste com a literatura que detectou uma média aumentada de PCRus em pacientes lúpicos com maior IMC, menor nível educacional, menor renda familiar e maior atividade de doença (Lee e col., 2008). O IMC no estudo de Lee e col. (2008) apresentou a maior correlação com a PCRus dentre todas as variáveis analisadas. Um outro trabalho afirmou que tanto pessoas pré-obesas quanto obesas selecionadas da população americana em geral foram mais propensas a terem níveis elevados de PCRus que os controles eutróficos (Visser e col., 1999). Talvez essa mesma relação não tenha sido detectada no corrente estudo

cruzado, devido ao reduzido tamanho da amostra.

Não houve redução significativa do índice de dano ao DNA (%) nas pacientes com LES do presente estudo cruzado após a ingestão de óleo de pequi em cápsula. Esse resultado contradiz um trabalho realizado com camundongos submetidos a uma dieta rica em colesterol suplementada com óleo de pequi, cujo resultado foi um efeito antioxidante importante, com redução do estresse oxidativo (Aguilar e col., 2012). E também contrasta com um trabalho feito com modelo de camundongo para LES que detectou redução do estresse oxidativo renal (peróxido de hidrogênio) após terapia antioxidante (Mathis e col., 2012). O corrente resultado também vai contra os achados de um estudo realizado com atletas de ambos os gêneros que ingeriram diariamente 400mg de óleo de pequi em cápsula durante 14 dias consecutivos. Nesses atletas houve diminuição da peroxidação lipídica testado pelo TBARS e redução do dano ao DNA por meio do teste do cometa. Também foi detectada uma redução da lesão muscular baseada na avaliação plasmática de TGO e TGP, essa última principalmente em mulheres (Miranda-Vilela e col., 2009 a), provavelmente devido à atividade antioxidante do pequi (Miranda-Vilela, 2009 b). Esse mesmo estudo verificou a queda significativa do CT e LDL no grupo acima de 45 anos, principalmente em homens (Miranda-Vilela e col., 2009 b). Em contraste a esse achado, não houve redução significativa de CT, LDL, TGO e TGP no corrente estudo cruzado. Esses resultados controversos, apesar da semelhança de dose diária de óleo de pequi e maior dose total (60 dias) podem ser explicados pelos métodos diferentes de extração do óleo nos dois estudos. No dos atletas, a extração foi orgânica pelo solvente clorofórmio e no corrente estudo foi por extração mecânica a frio. Já foi demonstrado que o extrato mecânico tem um maior teor de peróxido, o que demonstra maior vulnerabilidade, e, menor teor de carotenóides se comparado a extratos orgânicos (Ribeiro e col., 2012). Além disso, o tempo de armazenamento das cápsulas com óleo de pequi foi bem maior no corrente estudo que no dos atletas, o que pode ter contribuído para uma maior deterioração dos carotenóides. Outro fato que pode ter contribuído para a redução desse antioxidante foi a esterilização por radiação das cápsulas utilizadas no presente trabalho.

Entretanto, mesmo com toda essa diferença entre os métodos, houve redução significativa dos níveis de PCR ultra sensível no presente trabalho após o tratamento, resultado que corrobora com o estudo dos atletas (Miranda-Vilela e col., 2009 a). Outra pesquisa avaliou se a capacidade antioxidante total (CAOT) da dieta de trabalhadores e ex-trabalhadores de uma empresa exercia um

efeito independente e substancial na inflamação por meio da mensuração da PCRus. Foi encontrada uma associação inversa significativa entre a ingestão total de antioxidante e os níveis plasmáticos de PCRus. Foi concluído que a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes está associada a baixos níveis de PCRus (Brighenti e col., 2005). Um trabalho de revisão indica haver uma relação inversa entre fatores dietéticos como ômega 3, retinol, vitamina C, carotenoides com os níveis séricos de PCR. Todavia, não se sabe a ação desses agentes na regulação da produção de PCR (Montecucco e Mach, 2008).

Um outro trabalho demonstrou uma correlação positiva, independente e significante entre modificações dos níveis de *diacron reactive oxygen metabolites* (d-ROMs), um tipo de marcador do estresse oxidativo, e PCRus durante o período de um ano entre indivíduos assintomáticos de ambos os sexos, confirmando a inter-relação de estresse oxidativo e inflamação mesmo em indivíduos assintomáticos (Kotani e Taniguchi, 2011). Essa correlação positiva já foi identificada também em pacientes com LES com análise de PCR e peroxidação lipídica e proteica (CL-LOOH – hidroperóxido lipídico e AOPP – produtos proteicos de oxidação avançada) (Lozovoy e col., 2011). Contudo, um outro estudo realizado com pacientes com LES não encontrou essa associação entre isoprostano F₂ (marcador do estresse oxidativo) e PCR (Avalos e col., 2007).

Em uma coorte realizada com mulheres pareadas conforme idade e etnia em três grupos, com baixo (3mg/L), médio (3 a 20 mg/L) e alto valor (> 20mg/L) de PCRus foi detectado que esse marcador inflamatório aumenta significativamente os níveis de MDA *in vitro* e que 8-oxodesoxiguanosina (8-oxodG), importante marcador do estresse oxidativo, foi associado positivamente com os níveis de PCRus *in vivo*. No entanto, não foi observado aumento de dano ao DNA *in vitro* por meio do teste do cometa com as células tratadas com PCRus. Dessa forma, verificou-se que a PCRus não induziu as formas de dano ao DNA: quebra de fita simples e quebra de fita dupla, mas foi afirmado que a exposição prolongada à PCRus poderia ter provocado esses tipos de danos (Hooten e col., 2012).

Assim, parece que a inter-relação entre inflamação medida por PCRus e certas formas de estresse oxidativo mensurado por métodos diferentes (teste do cometa, d-ROMs, CL-LOOH, AOPP, 8-oxodG) é forte, pois esteve presente em mulheres de uma população geral, atletas, indivíduos assintomáticos e pacientes com LES, com e sem intervenção (óleo de pequi), apesar de não ter sido encontrada no presente estudo e no trabalho de Avalos e colaboradores (2007). Uma

possível explicação para não se ter encontrado essa relação no corrente trabalho cruzado foi a inclusão de pacientes com SLEDAI < 10, ou seja, não havia pacientes em alta atividade de doença. Pode-se observar a média (3mg/L) da PCRus antes de iniciar o uso das cápsulas, seus valores mínimos (0,9mg/L) e máximos (15mg/L) e o desvio-padrão (3,2 mg/L) estão dentro da classificação proposta por Hooten e col. (2012) de medida baixa e média de PCRus. Assim, os valores de PCRus das pacientes da presente pesquisa reduziram significativamente após o tratamento com óleo de pequi, entretanto, não o suficiente para refletir uma redução de dano de quebras simples e duplas no DNA. Talvez, se as pacientes tivessem um valor inicial de PCRus maior ou se o tempo de tratamento fosse maior, poder-se-ia ter observado a redução no %ID além da redução de PCRus após o tratamento.

Altos níveis séricos de PCR são induzidos por várias condições inflamatórias além da aterosclerose. Assim, a PCR não é apenas um marcador inflamatório sistêmico, mas também um fator pro-aterosclerótico local. Uma vez estabelecido um alto nível de PCRus, há o aumento do risco cardiovascular (Montecucco e Mach, 2008). A aterosclerose é um risco bem conhecido no LES (Symmons e Gabriel, 2011). Além disso, a prevalência e a mortalidade de doenças cardiovasculares é crescente entre os pacientes com LES (Lee e col., 2008), assim, esses indivíduos têm um risco cardiovascular muito aumentado se comparado à população em geral (Santos e col., 2012). Dessa forma, os achados do corrente estudo cruzado ganham importância na prática clínica na medida em que demonstram a redução significativa de um marcador inflamatório e preditor de aterosclerose com o uso de terapia antioxidante.

VII. LIMITAÇÕES

Apesar de se ter realizado um ensaio clínico sofisticado (estudo cruzado randomizado duplo cego), o corrente trabalho apresenta algumas limitações. Não há a garantia de que as pacientes ingeriram corretamente as cápsulas, conforme orientado, 1 cápsula (400mg de óleo de pequi) por dia durante 60 dias consecutivos. Outro fato importante foi a dificuldade de acesso de algumas pacientes ao Laboratório de Análises Clínicas do HUB. O ideal seria a coleta de sangue e urina e das medidas antropométricas no 61º dia após o tratamento ou placebo, porém, devido a esse acesso limitado, algumas vezes a coleta foi realizada depois de completada a terapia com o uso das cápsulas. Além disso, o método de extração usado neste trabalho foi de qualidade inferior ao utilizado em estudo prévio o que pode ter comprometido os resultados. As características peculiares e específicas da amostra impedem a extrapolação dos resultados para outras populações de pacientes com LES.

VIII. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais nas quais esta investigação foi conduzida e, baseado nos resultados obtidos, é lícito concluir que:

- o óleo de pequi em cápsula não foi capaz de reduzir as lesões oxidativas (quebra em fita simples e dupla) mensuradas por meio do índice de dano ao DNA obtido com o ensaio do cometa, o colesterol total e a fração LDL e os níveis de ácido úrico em mulheres com LES;
- porém, o óleo de pequi em cápsula foi eficiente em reduzir os níveis de proteína C reativa ultra sensível em mulheres com LES, o que indica a redução da inflamação com uso desse suplemento antioxidante;
- os pacientes com LES tiveram maior dano ao DNA em relação aos controles saudáveis o que sugere um estresse oxidativo aumentado (mensurado por meio do índice de dano ao DNA obtido com o ensaio do cometa).

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR E., JASCOLKA T., TEIXEIRA L., LAGES P., RIBEIRO A., VIEIRA E., PELUZIO M., ALVAREZ-LEITE J. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. *Braz. J. Med. Biol.*, v. 45, n. 7, p. 601-609, jul., 2012.

ALVES C., RESENDE J., CRUVINEL R., PRADO M. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenoides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) liofilizada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, n. 4, p. 830-839, out./dez. 2008.

AVALOS I., CHUNG C., OESER A., MILNE G., MORROW J., GEBRETSADIK T., SHINTANI A., YU C., STEIN C. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus*, v. 16, p. 195-200, 2007.

BAYIR H., KAGAN V. Bench-to-bedside review: mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis – there is nothing more practical than a good theory. *Critical Care*, v.12, p. 206, 2008.

BEZERRA E., VILAR M., BARBOSA O., SANTOS S., CASTRO M., TRINDADE M., SATO E. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Perfil Clínico-Laboratorial dos Pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (UFRN-Natal/Brasil) e Índice de Dano nos Pacientes com Diagnóstico Recente. *Rev Bras Reumatol*, v. 45, n. 6, p. 339-342, nov./dez., 2005.

BLACKBURN G., THORNTON P. Nutritional assessment of the hospitalized patients. *Med. Clin. North Am.*, v. 63, p. 1103 – 1115, 1979.

BOMBARDIER C., GLADMAN D., UROWITZ M., CARON D., CHANG C. Derivation of SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.*, v. 35, n. 6, p. 630-640, 1992.

BORBA E., LATORRE L., BRENOL J., KAYSER C., SILVA N., ZIMMERMANN A., PÁDUA P., COSTALLAT L., BONFÁ E., SATO E. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. Rev. Bras. Reumatol., v. 48, n. 4, p. 196-207, jul./ago., 2008.

BOSCH X. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. N. Engl. J. Med., v. 365, p. 758-760, ago. 2011.

BRIGHENTI F., VALTUEÑA S., PELLEGRINI N., ARDIGO D., RIO D., SALVATORE S., PIATTI P., SERAFINI M., ZAVARONI I. Total antioxidante capacity of the diet inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. Br. J. Nutr., v. 93, n. 5, p. 619-625, mai., 2005.

BROWN A. Lupus erythematosus and nutrition: a review of the literature. Journal of Renal Nutrition, v. 10, n.4, p. 170-183, out. 2000.

CARDOSO C., SIGNORELLI F., PAPI J., SALLES G. Prevalence and factors associated with dyslipoproteinemias in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. Rheumatol. Int., v. 28, p. 323-327, 2008.

CEMELI E., BAUMGARTNER A., ANDERSON D. Antioxidants and the comet assay. Mutation Research, v. 681, p. 51-67, 2009.

CERCHIARO D., HONÓRIO K. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. Química Nova, v. 34, n. 2, p. 300-305.

CHAIAMNUAY S., BERTOLI A., FERNANDEZ M., APTE M., VILÁ L., REVEILLE J., ALARCÓN G., LUMINA Study group. The Impact of Increased Body Mass Index on Systemic Lupus Erythematosus Data From LUMINA, a Multiethnic Cohort. J. Clin. Rheumatol., v. 13, p. 128-133, 2007.

COLLINS A., MA A., DUTHIE S. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mut. Res.*, v. 336, p. 69-77, 1995.

CORNIER M., DESPRÉS J., DAVIS N., GROSSNIKLAUS D., KLEIN S., LAMARCHE B., LOPEZ-JIMENEZ F., RAO G., ST-ONGE M., TOWFIGHI A., PIRIER P. Assessing adiposity: a scientific statement from the american heart association. *Circulation*, v. 124, n. 18, p. 1996-2019, nov., 2011.

COSTENBADER K., KANG J., KARISON E. Antioxidant intake and risks of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women. *Am. J. Epidemiol.*, v. 172, n. 2, p. 205-216, jun. 2010.

COVAS M., ELOSUA R., FITÓ M., ALCÁNTARA M., COCA L., MARRUGAT J. Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 34, n. 5, p. 814-819, mai., 2002.

CRIST B., ALEKEL L., RITLAND L., HANSON L., GENSCHEL U., REDDY M. Association of oxidative stress, iron, and centralizes fat mass in healthy postmenopausal women. *J Womens Helath*, v. 18, n. 6, p. 795-801, 2009.

DIAMOND B., BLOOM O., AL ABED I., KOWAL C., HUERTA P., VOLPE B. Moving towards a cure: blocking pathogenic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Intern. Med.*, v. 269, n. 1, p. 36-44, jan. 2011.

DORIA A., ARIENTI S., RAMPUDDA M., CANOVA M., TONON M., SARZI-PUTTINI P. Preventive strategies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, p. 192-197, 2008.

DUSINSKA M., COLLINS A. The comet assa yin human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 191-205, mar. 2008.

ENGELMAN H., ALEKEL D., HANSON L., KANTHASAMY A., REDDY M. Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. Am J Clin Nutr, v. 81, n. 3, p. 590-596.

FAIRBAIRN D., OLIVE P., O'NEILL K. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research, v. 339, p. 37-59, 1995.

FLORENCIO G., GONÇALVES A., CANÁRIO A., SILVA M. Envelhecimento uma reflexão sobre atividade física e estresse oxidativo em mulheres. Acta Med. Port., v. 24, p. 983-988, 2011.

FORTE W., ALMEIDA R., BIZUTI G., FORTE D., BRUNO S., FILHO F., LIMA C. Fagocitose por neutrófilos no lúpus eritematoso sistêmico. Rev. Assoc. Med. Bras., v. 23, n. 1, p. 35-39, 2003.

FURUKAWA S., FUJITA T., SHIMABUKURO M., IWAKI M., YAMADA Y., NAKAJIMA Y., NAKAYAMA O., MAKISHIMA M., MATSUDA M., SHIMOMURA I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. The journal of Clinical Investigation, v. 114, n. 12, dez., 2004.

GLADMAN D., GINZLER E., GOLDSMITH C., FORTIN P., LIANG M., UROWITIZ M., BACON P., BOMBARDIER S., HANLY J., HAY E., ISENBERG D., JONES J., KALUNIAN K., MADDISON P., NIVED O., PETRI M., RICHTER M., SANCHEZ-GUERRERO J., SNAITH M., STURFELT G., SYMMONS D., ZOMA A. The development and inicial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., v. 39, n. 3, p. 363-369, 1996.

GOZAL D., NAIR D., GOLDBART A. Physical activity attenuates intermitente hypoxia-induced spatial learning deficits and oxidative stress. Am. J. Respir. Crit. Care Med., v. 182, n. 1, p. 104-112, jul., 2010.

GRADINARU D., BORSA C., IONESCU C., MARGINA D., PRADA G., JANSEN E. Vitamin D status and oxidative stress markers in elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus. *Aging Clin. Exp. Res.*, set., 2012. Epub antes da impressão.

HASSAN S., GHEITA T., KENAWY S., FAHIM A., EL-SOROUGY I., ABDOU M. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis*, v. 14, n. 4, p. 325-331, 2011.

HEN K., BOGDAŃSKI P., SZULIŃSKA M., JABŁECKA A., PUPEK-MUSIALIK D. Influence of regular physical activity on oxidative stress in women with simple obesity. *Pol. Merkur. Lekarski*, v. 28, n. 166, p. 284-288, abr., 2010.

HOCHBERG M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v. 40, n. 9, p. 1725, 1997.

HOOTEN N., EJIUGU N., ZONDERMAN A., EVANS M. Association of oxidative DNA damage and C-reactive protein in women at risk for cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 32, n. 11, p. 2776-2784, nov., 2012.

HSIEH C., LIN B. Dietary factors regulate cytokines in murine models of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.*, v. 11, n. 1, p. 22-27, 2011.

IBARRA-COSTILLA E., CERDA-FLORES R., DÁVILA-RODRIGUES M., SAMAYO-REYES A., CALZADO-FLORES C., CORTÉS-GUTIÉRREZ E. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.*, v. 47, n. 1, p. 111-116, 2010.

JAIN S., MANNA P., MICINSKI D., LIEBLONG B., KAHN G., MOREHEAD L., HOELDTKE R., BASS P., LEVINE S. In African americans type 2 diabetic patients, is vitamin D deficiency associated with lower blood levels of hydrogen sulfide and cyclic adenosine monophosphate, and elevated oxidative stress? *Antioxid. Redox. Signal.*, set., 2012. Epub antes da impressão.

JANICKI-DEVERTS D., COHEN S., MATTHEWS K., GROSS M., JACOBS D. Socioeconomic status, antioxidant micronutrients, and correlates of oxidative damage: the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) Study. *Psychosom Med*, v. 71, n. 4, p. 541-548, 2009.

JALOSZYNSKI P., KUJAWSKI M., CZUB-SWIEREZEK M., SZYFTER K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutt. Res.*, v. 385, n. 3, p. 223-233, dec. 1997.

JOHNSON W., KYVIK K., SKYTTHE A., DEARY I., Sørensen T. Education modifies genetic and environmental influences on BMI. *PLoS One*, v. 19, n. 6, e16290, jan., 2011.

KEANEY, J., LARSON M., VASAN R., WILSON P., LIPINSKA I., COREY D., MASSARO J., SUTHERLAND P., VITA J., BENJAMIN E. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, n. 3, p. 434-439, mar., 2003.

KARAMAN A., BINICI D., MELIKOĞLU M. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutation Research*, v. 18, p. 1-5, 2011.

KLAUDE M., ERIKSSON S., NYGREN J., AHNSTRIJM G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, v. 363, p. 89-96, 1996.

KONTUSH A., CHANTEPIE S., CHAPMAN M. Small, dense HDL particles exert potente protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, v. 23, n. 10, p. 1881-1888, out., 2003.

KONTUSH A., DE FARIA E., CHANTEPIE S., CHAPMAN M. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis*, v. 182, n. 2, p. 277-285, out., 2005.

KOTANI K., TANIGUCHI N. Correlation between high-sensitivity C-reactive protein and reactive oxygen metabolites during a one-year period among asymptomatic subjects. *J. Clin. Med. Res.*, v. 4, n.1, p. 52-55, 2011.

KURIEN B., SCOFIELD R. Lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. *Indian J Exp Biol*, 2006, v. 44, n. 5, p. 349-356, 2006.

LEE S., SINGH S., MAGDER L., PETRI M. Predictors of high sensitivity C-reactive protein levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 17, p. 114-123, 2008.

LOZOVY M., SIMÃO A., ROTTER M., REICHE E., MORIMOTO H., LAVADO E. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 20, p. 1250-1259, 2011.

MATHIS K., VENEGAS-PONT M., MASTERSON W., STEWART N., WASSON K., RYAN M. Oxidative stress promotes hypertension and albuminuria during the autoimmune disease systemic lupus erythematosus. *Hypertension*, v. 59, n. 3, p. 673-679, 2012.

MCKELVEY-MARTIN V., GREEN M., SCHMEZER P., POOL-ZOBEL B., DE MEO M., COLLINS A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, v. 288, n. 1, p. 47-63, 1993.

MCKENNA D., MCKEOWN S., MCKELVEY-MARTIN V. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutageneses*, v. 23, n.3, p. 183-190, 2008.

MINAMI Y., SASAKI T., ARAI Y., KURISO Y., HISAMICHI S. Diet and systemic lupus erythematosus: a 4 year prospective study of japanese patients. *J. Rheumatol.*, v. 30, n. 4, p. 747-754, abr. 2003.

MIRANDA-VILELA A L, AKIMOTO A. K, ALVES P C Z, PEREIRA L C S, GONÇALVES C A, KLAUTAU-GUIMARÃES M N, GRISOLIA C K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant – Val9Ala. *Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1481-1495; 2009 a.

MIRANDA-VILELA A L, PEREIRA L, GONÇALVES C, GRISÓLIA C. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory makers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research*; 29; 850-858; 2009 b.

MIRANDA-VILELA A., GRISOLIA C., RESCK I., MENDONÇA M. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, 2310-2313, 2009 c.

MONTECUCCO F., MACH F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin. Interv. Aging*, v. 3, n. 2, p. 341-349, 2008.

NOSSENT J. SLICC/ACR Damage index in afro-caribbean patients with systemic lupus erythematosus: changes in and relationship to disease activity, corticosteroid therapy, and prognosis. *J. Rheumatol.*, v. 25, p. 654-659, 1998.

NUTTALL S., HEATON S., PIPER M., MARTIN U., GORDON C. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus – evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. *Rheumatology*, v. 42, p. 758-762, 2003.

OESER A., CHUNG C., ASANUMA Y., AVALOS I., STEIN M. Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v. 52, n. 11, p. 3651-3659, 2005.

OETES J. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, v. 43, n. 1, p. 56-63, 2010.

OLUSI S. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v. 26, n. 9, p. 1159–1164, set., 2002.

OSTLING O., JOHANSON K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 123, p. 291-298, 1984.

PATAVINO T., BRADY D. Natural medicine and nutritional therapy as an alternative treatment in systemic lupus erythematosus. *Alternative Medicine Review*, v. 6, n. 5, 2001.

PÉREZ Y., PÉREZ L., NETTO R., LIMA D., LIMA E. Malondialdehyde and sulfhydryl groups as biomarkers of oxidative stress in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol*, v. 52, n.4, p. 656-660, 2012.

POIRIER P., ALPERT M., FLEISHER L., THOMPSON P., SUGERMAN H., BURKE L., MARCEAU P., FRANKLIN B. On behalf of the American Heart Association Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiopulmonary Perioperative and Critical Care, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Nursing, and Council on Clinical Cardiology. Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2009, v. 120, p. 86–95.

PONS-ESTEL G., ALARCÓN G., SCOFIELD L., REINLIB L., COOPER G. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.*, v. 39, n. 4, p. 257-268, fev. 2010.

RASTMANESH R., BAER A. Possible augmentation of photosensitivity by dietary fuanocoumarins in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 20, p. 1005-1009, 2011.

RIBAS J. Investigação sorológica e clínica de auto-anticorpos em indígenas kaingang e guarani da reserva de Manguairinha do estado do Paraná. 2007. 160 p. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Paraná. 2007.

RIBEIRO M., VOLAS BOAS E., RIUL T., PANTOJA L., MARINHO H., SANTOS A. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2012.

ROBBINS S., COTRAN R., KUMAR V. *Patologia estrutural e funcional*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 páginas.

SANCHEZ-VAZNAUGH E., KAWACHI I., SUBRAMANIAN S., SÁNCHEZ B., ACEVEDO-GARCIA D. Differential effect of birthplace and length of residence on body mass index (BMI) by education, gender and race/ethnicity. *Soc. Sci. Med.*, v. 67, n. 8, p. 1300-1310, jul., 2008.

SANKHLA M., SHARMA T., MATHUR K., RATHOR J., BUTOLIA V., GADHOK A., VARDEY S., SINHA M., KAUSHIK G. Relationship of oxidative stress with obesity and its role in obesity induced metabolic syndrome. *Clin. Lab.*, v. 58, n. 5-6, p. 385-392, 2012.

SANTOS F., BORGES M., CORREIA M., TELLES R., LANNA C. Assessment of nutritional status and physical activity in systemic lupus erythematosus patients. *Bras J Rheumatol.*, v. 50, n. 6, p. 631-45, 2010.

SANTOS M., CARMONA-FERNANDES D., CANHÃO H., CANAS DA SILVA J., FONSECA J., GIL V. Early vascular alterations in SLE and RA patients – a step towards understanding the associated cardiovascular risk. *PLoS One*, v. 7, n. 9, e44668, epub., set., 2012.

SELLA E. E SATO E. Avaliação do Índice de Danos Permanentes Através de SLICC/ACR-DI em Pacientes com Mais de Cinco Anos de Diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Rev Bras Reumatol*, v. 44, n. 2, p. 115-22, mar./abr., 2004.

SINGH N., MCCOY M., TICE R., SCHNEIDER E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SYMMOUNS D., GABRIEL S. Epidemiology of CVC in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.*, v. 7, n. 7, p. 399-408, mai., 2011.

TABUR S., TORUN A., SABUNCU T., TURAN M., CELIK H., OCAK A., AKSOY N. Non-diabetic metabolic syndrome and obesity do not affect serum paraoxonase and arylesterase activities but do affect oxidative stress and inflammation. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 162, n. 3, p. 535-541, dez., 2009.

TAN E., COHEN A., FRIES J., MASI A., MCSHANE D., ROTHFIELD N., SCHALLER J., TALOL N., WINCHESTER R. The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v. 25, p. 1271-1277, 1982.

VASCONCELOS S., GOULART M., MOURA J., BENFATO V., KUBOTA L. Espécies reativas de oxigênio de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VINH QUỐC L., NGUYỄN L. The beneficial role of vitamin D in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Rheumatol.*, jul., 2012. Epub antes da impressão.

VISSER M., BOUTER L., MCQUILLAN G., WENER M., HARRIS T. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. JAMA, v. 282, n. 22, p. 2131-2135, dez., 1999.

ZHANG Q., YE D., CHEN P., ZHENG Y. Oxidative protein damage and antioxidante status in systemic lupus erythematosus, Clin Exp Dermatol, v. 35, n. 3, p. 287-294, 2009.

ZHANG H., XU S., TANG D., LIANG D., LIU H. Seasonal distribution of active systemic lupus erythematosus and its correlation with meteorological factos. Clinics, v. 66, n. 6, p. 1009-1013, 2011.

ZHU L., ZHANG T., PAN H., LI X., YE D. BMI, disease activity, and health-related quality-of-life in systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol, V. 29, p.1413–1417, 2010.

WANG G., PIERANGELI S., PAPALARDO E., ANSARI G., KHAN M. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. Arthritis Rheum., v. 62, n. 7, p. 2064-2072, 2010.

WASSON G., MCKELVEY-MARTIN V., DOWNES C. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. Mutagenesis, v. 23, n. 2, p. 153-162, fev., 2008.

WONG V., SZETO Y., COLLINS A., BENZIE I. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical reasearch. Current Topics in Nutraceutical Research, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2005.

Anexo 1: Critérios de classificação de LES do *American College of Rheumatology* revisados em 1997

1. Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2. Lesão discoide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4. Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5. Artrite: não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7. Comprometimento renal: proteinúria persistente ($> 0,5$ g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8. Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que $4000/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que $1500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que $100000/\text{mm}^3$ na ausência de outra causa).
10. Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolipídio com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina, b) teste positivo para anticoagulante lúpico, c) teste falso-positivo para sífilis por, no mínimo, 6 meses.
11. Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Fonte: Borba e col., 2008

Anexo 2: SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

Assinalar a pontuação se o evento estiver presente no dia da avaliação ou nos 10 dias prévios		
Pontos	Intercorrência	Definição
8 ()	Convulsão	Início recente. Exclui causa metabólica, infecciosa ou relacionada ao uso de fármacos
8 ()	Psicose	Perturbação grave da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, bizarro, desorganizado ou catatônico. Exclui uremia ou causa relacionada com fármacos
8 ()	Síndrome orgânica cerebral	Funções mentais alteradas de início súbito e caráter flutuante com dificuldade na orientação, memória ou outras funções intelectuais. Inclui turvação da consciência com diminuição ou (incapacidade) da atenção e pelo menos mais dois seguintes: perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Exclui causa metabólica, infecciosa ou relacionada a fármacos.
8 ()	Distúrbios visuais	Alterações retinianas do LES: presença de corpos citóides, hemorragias retinianas, exsudados serosos ou hemorrágicos da coroíde ou neurite óptica (não causado por hipertensão, uso de fármaco ou infecção)
8 ()	Distúrbios dos pares cranianos	Neuropatia sensitiva ou motora de novo envolvendo os pares cranianos.
8 ()	Cefaléia lúpica	Cefaléia severa, persistente, pode ter características de enxaqueca; resistente aos analgésicos e tratamentos habituais
8 ()	AVC	Acidente Vascular Cerebral de comprometimento recente. Exclui aterosclerose.
8 ()	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infartos periungueais, hemorragias subungueais lineares ou vasculite confirmada por biópsia ou angiografia
4 ()	Artrite	Dor e sinais flogísticos (calor, rubor, edema, dor) em mais de duas articulações
4 ()	Miosite	Mialgia ou fraqueza muscular proximal associada a elevação do creatinofosfocinase, aldolase, alterações eletromiográficas ou biópsia compatível com miosite
4 ()	Cilindrúria	Cilindros hemáticos, granulosos ou eritrocitários
4 ()	Hematúria	>5 hemácias/campo de sedimento urinário. Exclui outras causas (litíase, infecção)
4 ()	Proteinúria	>0,5g/ 24 horas ou aumento de >0,5g em relação a contagens basais
4 ()	Piúria	>5 leucócitos/ campo no sedimento urinário na ausência de infecção
2 ()	Novo rash cutâneo	Rash do tipo inflamatório de início recente ou recorrente
2 ()	Alopécia	Queda de cabelo excessiva, difusa ou localizada de início recente ou recorrente
2 ()	Úlceras mucosas	Úlceras orais ou nasais de início recente ou recorrente
2 ()	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural
2 ()	Pericardite	Dor pericárdica com mais um dos componentes: atrito, derrame, confirmação por ECG ou ecocardiograma
2 ()	Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2 ()	Anti-DNA elevado	Aumento acima de 25% acima dos valores de referência do laboratório
1 ()	Febre	Temperatura axilar >37,7°C na ausência de infecção
1 ()	Trombocitopenia	Plaquetas <100 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas)
1 ()	Leucopenia	Leucócitos <3000/ mm ³ (excluídas causas farmacológicas)
Pontuação total (0-105)		

Anexo 3: SLICC - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

Escore	Dano
	OCULAR
1	Catarata em qualquer olho, primária ou secundária à corticoterapia, documentada por oftalmoscopia
1	Alteração retinal documentada por oftalmoscopia
1	Atrofia óptica documentada por exame oftalmoscópico
	NEUROPSIQUIÁTRICO
1	Disfunção cognitiva (por exemplo, prejuízo de memória, dificuldade de cálculo, prejuízo da concentração, dificuldade de linguagem falada ou escrita) documentada por exame clínico ou teste neurocognitivo
1	Psicose maior definida por distúrbios graves da percepção da realidade caracterizados por delírios, alucinações auditivas ou visuais, incoerência, perda de associação de idéias, empobrecimento de idéias, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico
1	Convulsões caracterizadas por movimentos tônicos e clônicos, requerendo terapia anticonvulsivante por mais de seis meses
1 (2)	Acidente vascular cerebral que resulte em achados focais como paresia e fraqueza ou ressecção cirúrgica por outras causas, exceto malignidade (escore 2 se mais de um evento)
1	Neuropatia craniana ou periférica, excluindo-se neuropatia óptica, resultando em distúrbio motor ou sensitivo
1	Mielite transversa (fraqueza de membros inferiores ou perda sensitiva com perda do controle esfinteriano retal e urinário)
	RENAL
1	Taxa de filtração glomerular < 50%
1	Proteinúria $\geq 3,5$ g/24 horas
3	Insuficiência renal terminal (mesmo em diálise ou transplante)
	PULMONAR
1	Hipertensão pulmonar (proeminência de ventrículo direito ou ausculta em foco pulmonar)
1	Fibrose pulmonar (exame físico e radiografia)
1	<i>Shrinking lung syndrome</i> (radiografia)
1	Fibrose pleural (radiografia)
1	Infarto pulmonar (radiografia), ressecção por outra causa que não malignidade
	CARDIOVASCULAR
1	Angina <i>pectoris</i> ou angioplastia
1 (2)	Infarto agudo do miocárdio documentado por eletrocardiograma e perfil enzimático (escore 2 se mais de um evento)
1	Miocardiopatia (disfunção ventricular documentada clinicamente)
1	Doença valvular (murmúrio diastólico ou sistólico > 3/6)
1	Pericardite por seis meses ou pericardiectomia
	VASCULAR PERIFÉRICO
1	Claudicação persistente por seis meses
1	Perda tecidual menor (perda de polpa tecidual)
1 (2)	Perda tecidual significativa (por exemplo, perda digital ou de membro) (escore 2 se mais de um sítio)
1	Trombose venosa com edema, ulceração ou evidência clínica de estase venosa
	GASTROINTESTINAL
1 (2)	Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar por qualquer causa (escore 2 se mais de um sítio)
1	Insuficiência mesentérica com dor abdominal difusa ao exame clínico
1	Peritonite crônica com dor abdominal persistente e irritação peritoneal
1	Constricção esofágica observada por endoscopia ou cirurgia de trato gastrointestinal superior como correção da constrição, cirurgia de úlcera, etc., ou por história de insuficiência pancreática requerendo reposição enzimática ou por pseudocisto
	MUSCULOESQUELÉTICO
1	Atrofia muscular ou fraqueza muscular, demonstradas pelo exame físico
1	Artrite deformante ou erosiva (incluindo-se deformidades redutíveis e excluindo-se osteonecrose) no exame físico
1	Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo-se osteonecrose) demonstrada radiograficamente
1 (2)	Osteonecrose demonstrada por qualquer técnica de imagem (escore 2 se mais de um evento)
1	Osteomielite documentada clinicamente e confirmada por cultura ou ruptura tendínea
	DERMATOLÓGICO
1	Alopecia cicatricial crônica documentada clinicamente
1	Cicatriz extensa ou paniculite em localização diferente do couro cabeludo ou polpa tecidual, documentada clinicamente
1	Ulceração cutânea (excluindo-se trombose) por mais de seis meses
	FALÊNCIA GONADAL PREMATURA
1	Amenorréia secundária antes dos 40 anos de idade
	DIABETES
1	Requerendo tratamento e independente deste.
	MALIGNIDADE
1 (2)	Documentada por exame patológico, excluindo displasia (escore 2 se mais de um sítio)
	TOTAL

Anexo 4: Soluções utilizadas no ensaio do cometa

Produtos	Preparo	Conservação
Solução de PBS estoque		
137 mM NaCl Vetec®	8g	Temperatura ambiente, abrigada de luz
2,7 mM KCL ECIBRA®	0,2g	
10 mM Na ₂ HPO ₄ Grupo Química®	1,44 g	
2 mM KH ₂ PO ₄ ECIBRA®	0,24g	
	pH para 7,4 e completar para 1 litro com H ₂ O destilada	
Agarose LMP a 0,5%		
Agarose low melting point (LMP) pronadisa® conda laboratórios	0,1 g	Em geladeira
PBS 10X	2 ml	
H ₂ O	18 ml	
	Dissolver em microondas	
Agarose NMP a 1,5%		
Agarose normal melting point (NMP) GIBCOBRL® manufaturado por life technologies	300 mg	Em geladeira
PBS 10X	2 ml	
H ₂ O	18 ml	
	Dissolver em microondas	
Solução de lise estoque		
NaCl Vetec® 2,5 M	146,1 g	Temperatura ambiente, abrigada da luz
EDTA Vetec® 100mM	37,2 g	
Tris Vetec® 10 mM	1,2 g	
	Acertar o pH para 10, utilizando NaOH P.A., acrescentar 10 g de N-laurolyl-sarcosine (SIGMA-ALDRICH®) e completar para 1000 ml com água destilada	
Solução de lise uso		
Triton X-100 Merk®	1 ml	Em geladeira
DMSO Vetec®	10 ml	
	Completar para 100ml com solução lise estoque	
Solução de EDTA 0,2 M estoque		
EDTA Vetec®	14,89 g	Temperatura ambiente, abrigada da luz
H ₂ O destilada	100 ml	
	Acertar o pH para 10 e completar para 200 ml com H ₂ O destilada	
Solução de NaOH 10 M estoque		
NaOH Vetec®	200 g	Temperatura ambiente, abrigada da luz
H2O destilada	350 ml	
	Dissolver o NaOH na H ₂ O destilada e completar para 500 ml com H ₂ O	

	<u>destilada</u>	
<u>Solução de eletroforese</u>		
<u>EDTA 0,2 M</u>	<u>5 ml</u>	<u>Em geladeira</u>
<u>NaOH 10 M</u>	<u>30 ml</u>	
	<u>Completar para 1000 ml com água destilada, acertar o pH para 13</u>	
<u>Solução tampão de neutralização</u>		
<u>Tris 0,4 M Vetec®</u>	<u>48,5 g</u>	<u>Temperatura ambiente, abrigada da luz</u>
	<u>Acertar o pH para 7,5 com HCL P.A. Vetec®, completar para 1000 ml com H₂O destilada</u>	
<u>Solução de coloração a 200 µg/ml estoque</u>		
<u>Brometo de etídio SIGMA®</u>	<u>10 mg</u>	<u>Em geladeira, abrigada da luz</u>
<u>H₂O destilada</u>	<u>50 ml</u>	
<u>Solução de coloração 20 µg/ml uso</u>		
<u>Solução de coloração a 20 µg/ml estoque</u>	<u>100 µl</u>	<u>Em geladeira, abrigada da luz</u>
<u>H₂O destilada</u>	<u>900 µl</u>	

Apêndice 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Efeito anti-oxidativo do Pequi nos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

Você foi convidado(a) a participar de uma pesquisa. Este documento apresenta uma descrição da pesquisa e tem como objetivo ajudá-lo(a) a decidir se você deseja ou não participar. Os pesquisadores esclarecerão todas as suas dúvidas sobre este estudo.

Pesquisadores responsáveis pelo estudo:

1- Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto, telefones: (61) 34485568 e (61) 34485322

E-mail: leopoldo.l Luiz@uol.com.br

2- Thais Muniz Montalvão Sousa, telefone: (61) 34485231, celular: (61) 81459451

E-mail: thaismuniz@hotmail.com

Informações do estudo

O óleo de pequi contém diversos tipos de antioxidantes naturais (substâncias que trazem benefícios à saúde) e é rico em ácidos graxos monoinsaturados (um tipo de gordura considerada saudável). Assim, este estudo tem como objetivo verificar se óleo de pequi tem poder antioxidante de modo a trazer benefícios à saúde de pacientes com lúpus acompanhados pelo serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília e verificar se este óleo contribuirá para a redução da pressão arterial e para o controle do colesterol dos pacientes com lúpus. A pesquisa será desenvolvida no Hospital Universitário de Brasília e no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) e terá duração de 2 anos.

Procedimentos do estudo

A sua participação envolverá a ingestão de cápsulas de óleo de pequi ou de placebo (cápsulas que não contêm óleo de pequi) durante 60 dias, o preenchimento de um questionário durante as consultas habituais e a coleta de sangue de rotina antes e após a ingestão das cápsulas de pequi ou de placebo. Você não poderá consumir alimentos que contenham pequi, complexo multivitamínico, suplementos com ômega 3, nicotina e produtos que contenham cafeína 12 horas antes de cada coleta sanguínea. Você também não poderá consumir álcool e alimentos com álcool em sua composição três dias antes de cada coleta sanguínea. Se qualquer alteração importante na forma de realização deste estudo for necessária, você será informado(a) para decidir sob sua permanência na pesquisa. A participação é totalmente voluntária e você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento regular, bastando informar a decisão a um dos pesquisadores responsáveis.

Sigilo das informações

Todos os dados pessoais coletados durante esta pesquisa serão mantidos no mais rigoroso sigilo por meio da omissão total de todas as informações que permitam identificar você. Apenas você e os pesquisadores terão acesso aos resultados de seus exames.

Possíveis benefícios e riscos

Até o presente, não há relatos de efeitos colaterais após a ingestão de óleo de pequi, porém, se você perceber algum tipo de efeito, poderá entrar em contato com um dos pesquisadores. Além disso, a pesquisa pode não trazer benefícios diretos a você, mas vai gerar informações importantes para o tratamento dos pacientes com lúpus. Durante a coleta de sangue, pode ser que você sinta uma pequena dor e desconforto por causa da agulha e o local de entrada da agulha pode ficar roxo.

Custos da participação

Não há custos de participação no estudo e você não precisará retornar mais vezes ao hospital em decorrência de sua participação no estudo. Você continuará sendo responsável pelos custos de seu

tratamento médico habitual. Além disso, você não terá nenhum ganho financeiro por participar deste estudo.

Outras informações

Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo. Caso tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como paciente de pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa cujo telefone é 3307-2276, que avaliou e aprovou a realização deste estudo neste Hospital.

Termo de participação e assinaturas

Após ter lido e compreendido este termo concordo em participar voluntariamente deste estudo.

Brasília, ____ de _____ de 20__.

Nome do paciente: _____.

RG: _____. Assinatura: _____

Nome do
pesquisador: _____.

Assinatura: _____

Apêndice 2: Questionário para coleta de dados sociais, antropometria, medicamentos em uso e prática de atividade física

PROTOCOLO

Identificação

Nome: _____

Registro: _____ Data: ____ / ____ / ____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Idade: _____ anos Sexo: () Feminino () Masculino

Data do diagnóstico: ____ / ____ / ____

Estado civil: () solteiro(a) () casado(a) () divorciado(a) () viúvo(a) () amasiado(a)

Ocupação: () estudante () do lar () trabalhador(a) () desempregado(a)

() afastado(a) () aposentado(a) Nº de membros na família: _____ pessoas

Renda familiar mensal: () até 1 salário-mínimo () de 1 a 2 salários mínimos () de 2 a 5 salários mínimos () de 5 a 10 salários mínimos () de 10 a 20 salários mínimos () acima de 20 salários mínimos

Escolaridade: _____ anos estudados Grau de escolaridade: () não se aplica

() nível primário completo () nível fundamental completo () nível médio completo

() nível superior completo () pós-graduação

Cor da pele: () branca () amarela () negra () parda descendência asiática () parda descendência indígena () parda descendência negra

História social

Tabagista: () não () sim, tipo de cigarro: _____, frequência: _____

Etilista: () não () sim, tipo de bebida alcoólica: _____

Quantidade _____ frequência: _____

Realiza atividade física: () não () sim, tipo de atividade: _____

Desde: _____

Medicações em uso:

() _____, dose: _____, frequência: _____

() _____, dose: _____, frequência: _____

() _____, dose: _____, frequência: _____

() _____, dose: _____, frequência: _____

() _____, dose: _____, frequência: _____

() _____, dose: _____, frequência: _____

Antropometria

Peso usual: _____ Kg em _____ Peso atual: _____ kg Altura: _____ cm

%Perda Ponderal Recente: _____ cm Índice de Massa Corporal: _____ kg/m²

Circunferência da cintura: _____ cm Circunferência do quadril: _____ cm

Relação cintura/quadril: _____

Circunferência do braço: _____ cm % de adequação _____ %

Prega cutânea tricipital: _____ mm % de adequação _____ %

Circunferência muscular do braço: _____ cm % de adequação: _____ %

Apêndice 3: Artigo aceito para publicação na revista Advances in Bioscience and Biotechnology

DNA damage levels in systemic lupus erythematosus patients with low disease activity: an evaluation by comet assay

Thaís Muniz Montalvão^{1,2}, Ana Luisa Miranda-Vilela³, Mariana Matos Roll², Cesar Koppe Grisolia², Leopoldo Santos-Neto^{1,4}

¹University Hospital of Brasília, University of Brasília, Brasília/DF, Brazil

²Laboratory of Genetic Toxicology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília/DF, Brazil

³Department of Genetics and Morphology, Laboratory of Genetics, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília/DF, Brazil

⁴Associated Professor, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília/DF, Brazil

Email: thaismunizms@gmail.com

Received 30 September (2012).

ABSTRACT

Oxidative stress has been implicated in the inflammatory process of Systemic Lupus Erythematosus (SLE), particularly by the formation of anti-DNA autoantibodies, which can lead to DNA damage. The aim of this study was to investigate, through comet assay, whether the level of DNA damage in SLE patients is different from that of healthy subjects. Twenty-five adult SLE patients with SLEDAI up to ten, and 25 healthy subjects were paired according to age, gender and Body Mass Index (BMI). Other anthropometric variables were also assessed. Comet assay was assessed as the marker of oxidative stress described as DNA Damage (DD) percentage. Waist Circumference (WC), Hip Circumference (HC) and BMI were also performed. Exclusion criteria for patients and controls comprised smoking and other chronic disorders. Level of damage index was remarkably higher in SLE patients than in controls, and no significant differences between the groups were found for age, BMI, WC and HC. No stratification concerning gender was performed, since there were just two males per group. No correlation was observed between BMI and DD (%). DD increased in SLE, which reflects the oxidant/antioxidant imbalance in these patients. These findings support an association between oxidative stress and SLE. This stronger correlation observed in patients with low disease activity may be useful in elucidating the mechanisms of disease pathogenesis.

Keywords: systemic lupus erythematosus; DNA damage; comet assay; oxidative stress

